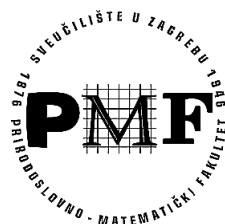


Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek



Ivona Cvetković

Sastav masnih kiselina u murine žutošarke (*Muraena helena* Linnaeus, 1758) i  
jegulje (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758)

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, na odjelu za animalnu fiziologiju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem se izv.prof.dr. Domagoju Đikću na stručnim savjetima i sposobnosti održavanja ležernog pristupa u skladu s visokom akademskom razinom.

Hvala mojim prijateljima koji su mi bili velika podrška tokom svih godina studiranja, a najviše Ivani i Tihani.

Najviše hvala mojim roditeljima Zoranu i Tihomili i mojoj braći Borislavu i Miljenku, koji su mi omogućili studiranje te bili bezuvjetna podrška tokom cijelog studija.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## SASTAV MASNIH KISELINA U MURINE ŽUTOŠARKE (*Muraena helena* Linnaeus, 1758) I JEGULJE (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758)

Ivona Cvetković

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Jedni od najpoznatijih spojeva organske kemije, koji sudjeluju u raznovrsnoj regulaciji mehanizama stanice, a time i cijelog organizma, jesu masne kiseline. One imaju bitnu ulogu na više područja. Služe kao signalne molekule, sudjeluju u izgradnji membrana i predstavljaju izvor energije i pogonsko gorivo za organizam. Zbog svoje svestranosti razlikujemo više podjela masnih kiselina pa govorimo o podjeli na razni zasićenosti i nezasićenosti (količini dvostrukih veza), broju ugljikovih atoma, esencijalnosti i neesencijalnosti, na razini vezanosti za druge biokemijske molekule (slobodne ili vezane masne kiseline), itd. Masne kiseline pronalazimo i kod riba, gdje sudjeluju u sazrijevanju gonada, toplinskoj prilagodbi, imunološkom sustavu i pohrani energije. Ribe koje su važne zbog svoje mogućnosti proizvodnje esencijalnih masnih kiselina dolaze iz porodice jeguljki. Predstavnici su im jegulja i murina. Cilj istraživanja ovoga rada je usporediti sastav masnih kiselina ovih dviju vrsta.

(46 stranica, 19 slika, 2 tablice, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: masne kiseline, jegulja, murina, omjer

Voditelj: izv. prof. dr. Domagoj Đikić

Ocjenitelji: (doc. dr. sc. Renata Šoštarić, izv. prof. dr. sc. Petar Kružić, doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević)

Rad prihvaćen: 8. rujna 2016

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### LIPID PROFILES OF MEDITERRANEAN MORAY (*Muraena helena* Linnaeus 1758) AND THE EUROPEAN EEL (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758)

Ivona Cvetković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Some of the best known compounds of organic chemistry that participate in the regulation of diverse regulation mechanisms of cells, and consequently the whole body, are the fatty acids. Thus, they have important role in several areas. They serve as signaling molecules, participate in the construction of membranes and they are a source of energy and fuel for the organism. Due to its versatility we can find different divisions of fatty acids. For example, division based on different saturation and unsaturation (amount of double bond), the number of carbon atoms, essentiality and non-essentiality, and the level of attachment to other biochemical molecules (free or bound fatty acids), etc. We can find fatty acids in fish, where they participate in the maturation of the gonads, thermal adaptation, immune system and saving energy. Because of their possibilities of production of the essential fatty acids, members of the order *Anguilliformes* (True eels), are of high importance. Their representatives are European eel and Mediterranean moray. The aim of this work is to compare the fatty acid composition of these two species.

(46 pages, 19 figures, 2 tables, 27 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: fatty acids, European eel, Mediterranean moray, ratio

Supervisor: izv.prof.dr. Domagoj Đikić

Reviewers: (doc. dr. sc. Renata Šoštarić, izv. prof. dr. sc. Petar Kružić, doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević)

Thesis accepted: September 8<sup>th</sup>, 2016

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Otkriće masnih kiselina.....	2
1.2. Struktura masnih kiselina.....	2
1.3. Svojstva masnih kiselina .....	3
1.4. Podjela prema broju atoma .....	3
1.5. Podjela prema broju i poziciji dvostrukih veza .....	4
1.5.1. Nezasićene masne kiseline .....	5
1.5.1.1. Konjugirane i trans masne kiseline .....	7
1.5.1.2. Esencijalne i neesencijalne masne kiseline .....	9
1.5.2. Zasićene masne kiseline.....	11
1.6. Kiselost.....	12
1.7. Međudjelovanje masnih kiselina .....	12
1.8. Slobodne masne kiseline.....	13
1.9. Sintaza i beta oksidacija masnih kiselina.....	13
1.9.1. Sintaza masnih kiselina .....	13
1.9.2. Beta oksidacija masnih kiselina.....	16
1.9.2.1. Beta oksidacija masnih kiselina u peroksisomima .....	18
1.10. Masne kiseline kod riba.....	19
1.11. Jeguljke ( <i>Anguilliformes</i> ) .....	21
1.11.1. Jegulja .....	23
1.11.2. Murina žutošarka .....	24
1.12. Cilj istraživanja.....	25
2. MATERIJALI I METODE .....	26
2.1. Prikupljanje uzoraka riba .....	26
2.2. Metode .....	27
3. REZULTATI .....	29
4. RASPRAVA .....	38
5. ZAKLJUČAK.....	41
6. LITERATURA .....	42
7. ŽIVOTOPIS.....	45

## POPIS KRATICA

Acetil CoA- acetil koenzim A (engl. *acetyl coenzyme A*)

ARA- arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*)

ATP- adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

$\alpha$ -LNA-  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl.  *$\alpha$ -linolenic acid*)

DHA- dokozaheksanska kiselina (engl. *docosahexanoic acid*)

DPA- dokozapentanska kiselina (engl. *docosapentanoic acid*)

EPA-eikozapentanska kiselina (engl. *eicosapentanoic acid*)

EU- Europska unija

FAD- flavin adenin dinukleotid (engl. *flavin adenine dinucleotide*)

IUPAC- Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LSD-test- test najmanje značajne razlike (engl. *least significant difference test*)

MUFA- mononezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*)

PUFA- polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

RH- Republika Hrvatska

SCFA- kratkolančane masne kiseline (engl. *short chain fatty acids*)

SFA- zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*)

UFA- nezasićene masne kiseline (engl. *unsaturated fatty acids*)

## 1. UVOD

Masne kiseline su spojevi koji ulaze u sastav prirodnih masti i ulja, obično dugih, nerazgranatih lanaca. Najčešće imaju paran broj ugljikovih atoma (od četiri do dvadeset šest). Dijelimo ih na zasićene i nezasićene masne kiseline. Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke veze, niti druge funkcionalne grupe. Ugljikovi atomi u takvim masnim kiselinama, pored međusobnih, grade veze samo s vodikom (osim u COOH grupi). S obzirom na lance koje posjeduju, vrlo gusto se pakiraju i na taj način omogućavaju živim bićima da na manjem prostoru skladište veliku kemijsku energiju. Upravo zato imaju najveći udio u masnom tkivu životinja. Nezasićene masne kiseline su slične građe, ali posjeduju jednu ili više dvostrukih veza u osnovnom ugljikovom lancu (mononezasićene i polinezasićene) (Aitzetmüller i sur, 1994).

Masne kiseline su važni spojevi u komparativnoj fiziologiji i biokemiji jer sudjeluju u različitim regulacijskim mehanizmima u fiziologiji riba, ali i drugih kralješnjaka, pa tako i čovjeka. Masne kiseline kod tih riba sudjeluju u sazrijevanju gonada, toplinskoj prilagodbi, pohrani energije i imunološkom sustavu (Baeza i sur., 2015), kroz trofičke lance prenose se iz morskih jednostaničnih organizama koji imaju sposobnost njihove sinteze, stoga su bitni u prehrani riba. Komparativna interspecijska i intraspecijska istraživanja pokazuju nekoliko grupa riba koje su u mogućnosti sintetizirati, biokemijski mijenjati i uskladištiti esencijalne masne kiseline. Riba koje su poznate kao bogat izvor masnih kiselina su: lososi, ugotice i jeguljke (Arai i Takeda, 2012).

Jeguljke (*Anguillidae*) su porodica riba kojima pripada i jegulja (*Anguilla anguilla* L. 1758). Većina jeguljki su noćni grabežljivci, a tijelo im je dugačko i zmijoliko te na njemu imaju male ljuske. Većina vrsta jeguljki živi u tropskim i subtropskim morima. Za razliku od jegulje, murina spada u rod riba iz porodice *Muraenidae*, iz razreda zrakoperki. Nema ljusaka, a koža joj je lijepe boje i prekrivena je sitnim pjegama. Murina je danju skrivena u pukotinama podvodnih stijena odakle joj viri samo glava (Arai i Takeda, 2012). U Jadranu živi murina žutošarka (*Muraena helena* L. 1758).

Postoji znatna literatura o masnim kiselinama kod riba koje su od ekonomske važnosti, kao što su jegulje. Podatci o skupinama masnih kiselina vezanih za fiziologiju drugih vrsta



jeguljastih riba su rijetki ili nedostaju. Iznenadujuće, za murine ne postoje podatci o masnim kiselinama, iako je ova vrsta poznata od antičkih vremena i koristi se u prehrani u mediteranskim zemljama (Đikić i sur., 2013).

Cilj rada je usporediti kvantitativni i kvalitativni sastav lipida u murine i jegulje. Podatci bi trebali dati osnovnu sliku o sastavu lipida u murine žutošarke koja je holotipski predstavnik čitave porodice *Muraenide* za koje ne postoje podatci o sastavu lipida osim za jednu vrstu roda *Gymnothorax* (Đikić i sur., 2013).

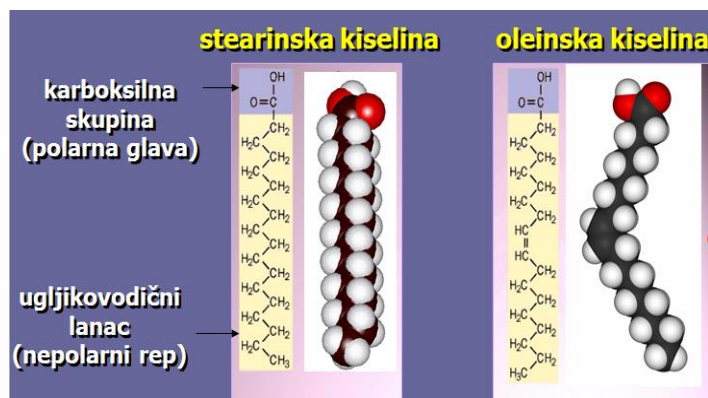
### **1.1. Otkriće masnih kiselina**

1927. godine znanstvenici Evans i Burr u svojem su eksperimentu pokazali da životinje hranjene prehranom bez masnoća obolijevaju od nepravilnosti u rastu i reproduktivnim funkcijama. Saznanje da su masti važne za život navelo je znanstvenike na pomisao da se u mastima nalazi sastojak važan za život te su mu nadjenuli ime vitamin F. Godine 1929. znanstvenici Evans i Burr nalaze i demonstriraju kako je sastojak masti neophodan za život i zdravlje u mastima, linolenska kiselina. U odsustvu ovog važnog sastojka masti, razvijaju se poremećaji od kojih su prvi uočljivi ljuštenje kože, zadržavanje vode u tkivima, poremećaji u razmnožavanju i plodnosti i poremećaji u rastu. Tako se razvio pojam esencijalne masne kiseline koji označava masnu kiselinu neophodnu za život i zdravlje, a koju tijelo ne može samo proizvoditi već se, poput vitamina i minerala, mora unositi prehranom.

Do otkrića da je još jedna masna kiselina neophodna za život i zdravlje ljudi došlo je tek sedamdesetih godina prošlog stoljeća kada se otkrilo da je nedostatak omega 3 masne kiseline povezan sa lošom elektroretinografskom snimkom u životinja. Tek se godine 1982. došlo do saznanja da je omega 3 masna kiselina neophodna za zdravlje i život ljudi.

### **1.2. Struktura masnih kiselina**

Masne se kiseline proizvode hidrolizom estera koji se povezuju s mastima ili biološkim uljima uklanjanjem alkohola glicerola. Njihova ih struktura čini amfipatskim molekulama, odnosno molekulama koje na jednom svom kraju privlače, a na drugom odbijaju vodu (Stryer 2011). Masna kiselina se sastoji od polarne glave i nepolarnog repa (Slika 1).



**Slika 1. Struktura masnih kiselina (preuzeto i prilagođeno s [www.tehnologijahrane.com](http://www.tehnologijahrane.com))**

### 1.3. Svojstva masnih kiselina

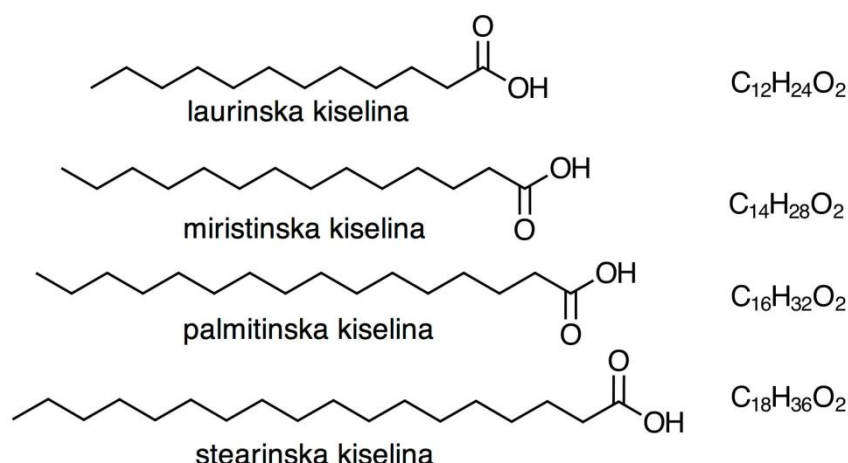
Masne kiseline uz kolesterol, triacilglicerole, glikolipide, fosfolipide pripadaju skupini lipida. Lipidi (grč. *lípos*, mast) su organske tvari različite kemijske građe, podrazumijevaju masti i ulja, voskove, steroide. Zajedničko svojstvo im je netopljivost u vodi i izuzetno dobra topljivost u organskim otapalima. Nastaju reakcijom masne kiseline i alkohola ili amina. Možemo ih podijeliti prema porijeklu (biljni, životinjski), kemijskom sustavu (osapunjivi i neosapunjivi), složenosti strukture (jednostavni, konjugirani, derivati lipida) i ulozi (strukturni, regulatorni, rezerva energije) (Hara, 2013).

Tri glavne uloge lipida, tj. masnih kiselina su:

- skladištenje energije
- izgradnja bioloških membrana
- prijenos signala među stanicama

### 1.4. Podjela prema broju ugljikovih atoma

I biljni i životinjski organizmi naslijedili su arhaične načine sinteze masnih kiselina u kojima se masne kiseline grade dodavanjem dva po dva ugljikova atoma. Stoga većina masnih kiselina ima paran broj ugljikovih atoma. Naravno, postoje i masne kiseline koje imaju neparan broj ugljikovih atoma, ali većina biljnih ulja i životinjskih masnoća sadrže masne kiseline s parnim brojem (Stryer, 2011).



**Slika 2. Struktura masnih kiselina (izvor:<http://www.fao.org/documents/en/>)**

Na slici 2. vidimo slijed ovakve sinteze na primjeru četiri masne kiseline koje se upravo razlikuju u broju ugljikovih atoma. Kemijski sastav masnih kiselina u trigliceridima omogućuje praktičnu upotrebu. Primjerice, u proizvodnji sapuna, biljna ulja bogata laurinskom kiselinom, poput kokosa, daju sapune koji se odlično pjene i čiste, ali su i mekše konzistencije. Ulja bogata palmitinskom i stearinskom kiselinom, poput palme, daju sapune koji su daleko tvrđi i otporniji na raspad, stoga su vrlo popularna u proizvodnji sapuna.

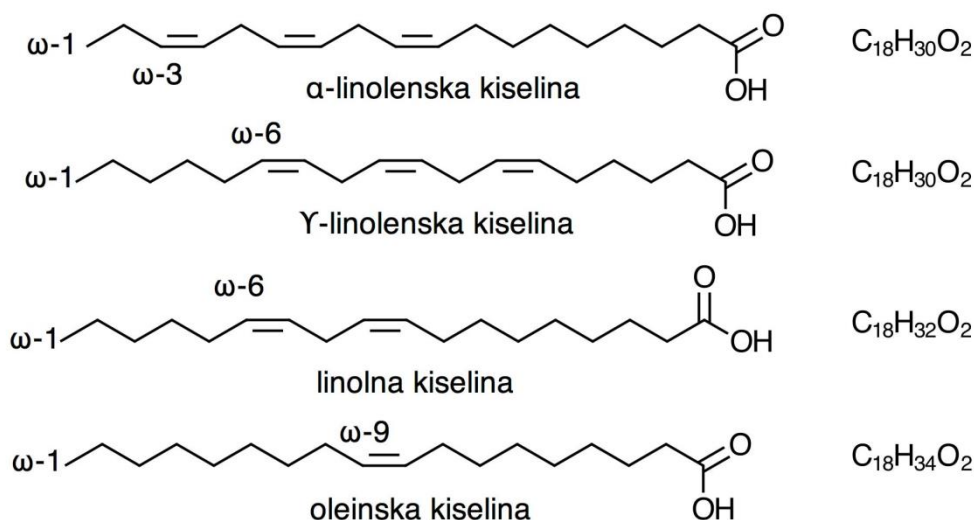
Postoji još jedna važnost broja ugljikovih atoma u masnim kiselinama. Masne kiseline vrlo kratkih lanaca (SCFA, *short chain fatty acids*) igraju važnu ulogu u zdravlju crijeva. Stvaraju ih bakterije iz ljudskih crijeva, pogotovo iz rodova *Clostridium* (Rolfe, 1984) i *Fusobacterium*. Naime, SCFA igraju važnu ulogu u prevenciji tumora debelog crijeva, bez obzira što postoji niz kontradiktornih podataka.

### 1.5. Podjela prema broju i poziciji dvostrukih veza

Broj i pozicija dvostrukih veza između ugljikovih atoma diktira mnoga kemijska i biološka svojstva masnih kiselina. Ulja bogata nezasićenim masnim kiselinama (jedna ili više dvostrukih veza) su tekuća, ona bogata zasićenim masnim kiselinama (bez dvostrukih veza) obično su na sobnoj temperaturi konzistencije maslaca.

### 1.5.1. Nezasićene masne kiseline

Dobar primjer kako se razlikuju nezasićene masne kiseline s istim brojem ugljikovih atoma, ali drugačijim brojem i pozicijom dvostrukih veza prikazan je na Slici 3.



**Slika 3. Struktura masnih kiselina (izvor:<http://www.fao.org/documents/en/>)**

Linolna kiselina ima dvije dvostruke veze, dok γ-linolenska i α-linolenska imaju tri dvostruke veze (Slika 3). Ulja bogata polinezasićenim masnim kiselinama obično su brže kvarljiva jer više dvostrukih veza znači i veću mogućnost da ih “napadne” kisik iz zraka i da dođe do procesa oksidacije. Stoga se ulje sjemenki lana lakše kvvari od maslinovog ulja.

Ako su masne kiseline nezasićene, one mogu biti mono-nezasićene, poput oleinske kiseline koja ima jednu dvostruku vezu. Oleinska kiselina čest je sastojak biljnih ulja, poput maslinovog. Engleska skraćenica za ovakve masne kiseline je MUFA (*monounsaturated fatty acids*). Mononezasićene masne kiseline su obično u tekućem stanju na sobnoj temperaturi, ali ako na duži vremenski period odstoje na istoj takvoj temperaturi postat će krutina. Uzimanje mononezasićenih masnih kiselina umjesto zasićenih i trans masti može sniziti razinu kolesterola i smanjiti rizik od srčanih bolesti i moždanog udara. Mononezasićene masne kiseline su usko vezane s količinom vitamina E koji u organizmu ima važnu ulogu jer djeluje kao antioksidans. Većina namirnica sadrži kombinaciju masti, ali avokado, kikiriki maslac,

orasi, sjemenke, maslinovo ulje, ulje kikirikija, repičino ulje, sezamovo ulje i suncokretovo ulje su proizvodi u kojima se nalaze velike količine mononezasićenih masnih kiselina (Heimann, 1982).

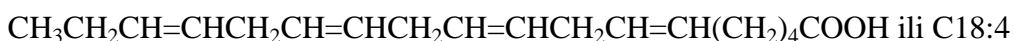
Ako masna kiselina sadrži više dvostrukih veza, govorimo o polinezasićenim masnim kiselinama, PUFA (*polyunsaturated fatty acids*). Kao i kod mononezasićenih, agregatno stanje polinezasićenih masnih kiselina tekuće je na sobnoj temperaturi (Jaya-Ram, 2016). Razlika je u tome što kod polinezasićenih masnih kiselina nakon dužeg ostajanja na istoj temperaturi ne dolazi do promjene agregatnog stanja, tj. takve masti ostaju tekuće. Kad se jede u umjerenim količinama, polinezasićene masti mogu sniziti razinu kolesterola i smanjiti rizik od srčanih bolesti (Goodnight, 1982). Izvori polinezasićenih masti su sojino ulje, kukuruzno ulje, ulje šafranke, losos, pastrva, skuša, haringa, orasi i sjemenke suncokreta.

Nije svejedno niti gdje se dvostruke veze nalaze u strukturi masne kiseline. Ugljikov atom najudaljeniji od karboksilne skupine naziva se  $\omega$ -1 pozicija. Ovisno o tome gdje se nalazi prva dvostruka veza od  $\omega$ -1 pozicije, masne kiseline mogu biti  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 i  $\omega$ -9. U rijetkim slučajevima postoje i drugačije pozicije. Ova pozicija ima vrlo veliku važnost za biološko djelovanje. Naime, životinjski organizmi izgubili su tijekom evolucije sposobnost stvaranja dvostruke veze na jako udaljenim pozicijama poput  $\omega$ -3, te ovise o biljnim izvorima takvih masnih kiselina (Tocher, 2015). Za razliku od njih, ljudski organizam lako sintetizira  $\omega$ -9 kiselinu poput oleinske, no to ne znači da takva ulja nemaju važnosti u prehrani. Omega oznaka jako se infiltrirala u opću kulturu, te danas gotovo svatko poznaje naziv  $\omega$ -3, zbog brojnih preparata na tržištu.

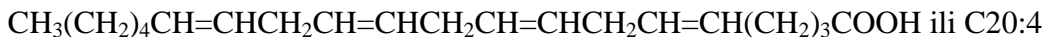
Primjeri nezasićenih masnih kiselina:

1. Miristoleinska kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  ili C14:1
2. Palmitoleinska kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  ili C16:1
3. Oleinska kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  ili *cis*- $\Delta^9$  ili C18:1
4. Linolna kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  ili C18:3
5. Linolenska kiselina:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  ili C18:3

6. Stearidonska kiselina:



7. Arahidonska kiselina:



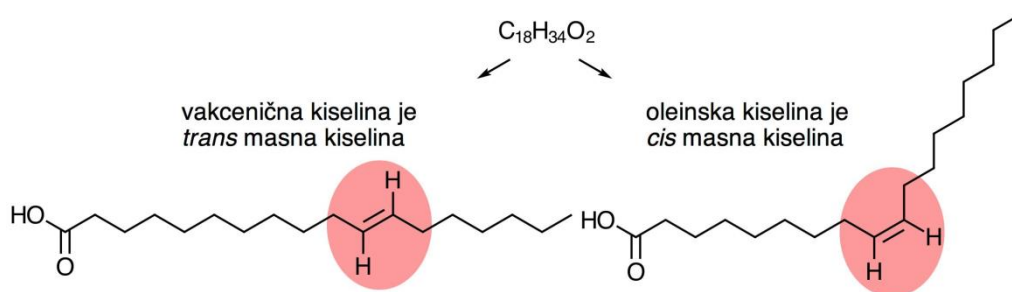
8. Eikozapentenska kiselina:  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$  ili  $\text{C}_{22}:6$

9. Dokosaheksenska kiselina:  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$  ili  $\text{C}_{22}:6$

10. Eručna kiselina:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$  ili  $\text{C}_{22}:1$

#### 1.5.1.1. Konjugirane i trans masne kiseline

Posebnu podvrstu masnih kiselina čine konjugirane masne kiseline. Konjugirane masne kiseline imaju konjugirane dvostruke veze (dvostruke veze koje se naizmjenice mijenjaju s jednostrukima), za razliku od uobičajenih masnih kiselina kojima su dvostruke veze odvojene s više jednostrukih veza među ugljikovim atomima (Milovanović, 2009). Većina prirodnih konjugiranih masnih kiselina su *trans* masne kiseline. Naime, najveći broj “klasičnih” masnih kiselina (linolna, oleinska,  $\alpha$ -linolenska,  $\gamma$ -linolenska) su *cis* masne kiseline. Razlika između *cis* i *trans* masnih kiselina prikazana je na Slici 4. Kod *cis* masnih kiselina vodikovi atomi vezani na dva ugljika povezani dvostrukom vezom su smješteni u istoj ravnini (na “isto strani”). Kod *trans* masnih kiselina ta dva vodika su na drugačijim ravninama (smješteni su “nasuprotno”).



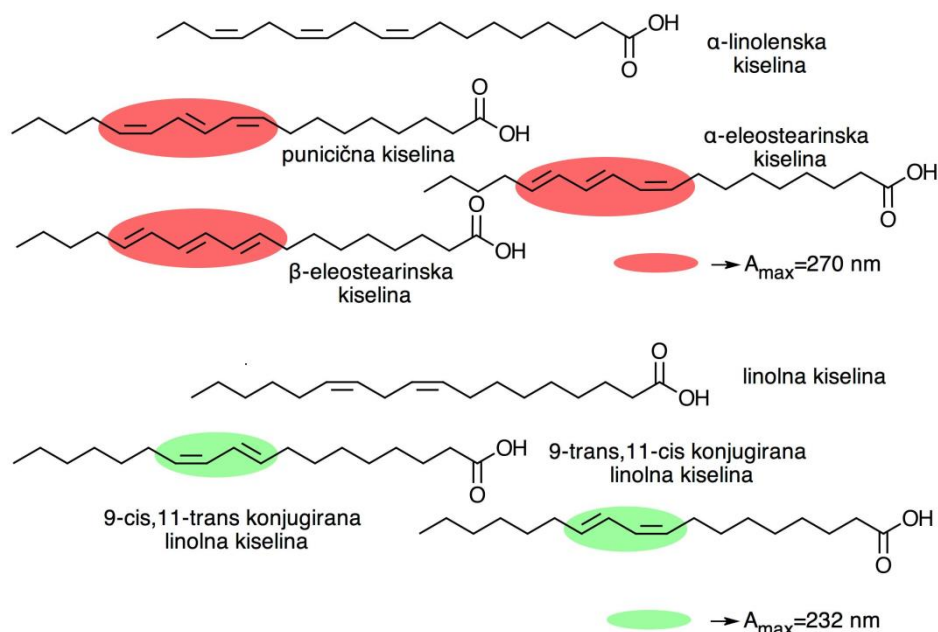
Slika 4. Cis i trans masne kiseline (izvor:<http://www.fao.org/documents/en/>)

*Trans* masne kiseline i konjugirane masne kiseline nisu sinonimi. *Trans* masne kiseline mogu sadržavati samo jednu *trans* dvostruku vezu, dok konjugirane masne kiseline uvijek sadrže više dvostrukih veza, kako smo već definirali, od kojih jedna ili više dvostrukih veza mogu biti u *trans* poziciji.

*Trans* i konjugirane masne kiseline u našoj prehrani dolaze iz više izvora:

- iz biljaka koje direktno, enzimskim procesima, stvaraju *trans* i konjugirane masne kiseline. Primjer za to je ulje sjemenki nara (*Punica granatum*, L. 1753) koje sadrži puničnu kiselinu.
- iz mesa i mlijeka preživača u čijem probavnom sustavu pod djelovanjem bakterija nastaju *trans* masne kiseline. Primjer za to je vakcenična kiselina koja dominira u sastavu kravlje mesa te mlijeka i mliječnih prerađevina. Osim vakcenične kiseline, u mlijeku i mesu preživača nalazi se i manja količina konjugirane linolne kiseline (CLA), koja je *cis*-9, *trans*-11 kiselina. U Europi koja je limitirala unos industrijskih *trans* masnih kiselina, ovo je glavni izvor *trans* i konjugiranih masnih kiselina u hrani.
- u ljudskom organizmu, a nastaju iz drugih *trans* masnih kiselina unesenih prehranom.
- procesom industrijske hidrogenacije (zasićenja) masnih kiselina, koje se provodi kako bi se ulja pretvorila u maslance i učinilo ih prikladnim za prženje i povećala stabilnost. Ovakva ulja nekoć su dominirala u margarinima, a danas se postupci u kojima nastaju industrijske *trans* masne kiseline izbjegavaju radi rizika po ljudsko zdravlje. Za razliku od *trans* masnih kiselina iz preživača gdje dominira vakcenična kiselina (*trans*-11), kod industrijskih *trans* masnih kiselina dominira *trans*-9 izomer oleinske kiseline, nazvan elaidična kiselina.
- procesom oksidacije nezasićenih masnih kiselina tijekom skladištenja biljnih ulja.

Nastanak takvih *trans* i konjugiranih nezasićenih masnih kiselina tijekom skladištenja koristi se u kontroli kvalitete. Tijekom skladištenja, najprije nastaju peroksidi masnih kiselina, a nakon toga nastaju iz njih *trans* i konjugirane masne kiseline (Slika 5).



**Slika 5. Konjugirane masne kiseline (izvor:<http://www.fao.org/documents/en/>)**

Iz α-linolenske kiseline nastaju konjugirane masne kiseline s tri dvostruke veze, dok iz linolne kiseline nastaju konjugirane masne kiseline s dvije dvostruke veze. Konjugirane masne kiseline s dvije dvostruke veze pokazuju maksimum apsorpcije UV zračenja od 232 nm, a one s tri veze od 270 nm. Ovo je vrlo važno za kontrolu kvalitete biljnih ulja.

*Trans* masne kiseline postale su ozloglašene molekule prije svega zbog procesa industrijske hidrogenacije ulja u margarine. Stoga već sam njihov naziv izaziva odbojnost, ali ne treba zaboraviti da je biološko djelovanje *trans* masnih kiselina vrlo raznoliko i ovisi o izvoru. Zaboravljamo da je punična kiselina biljnog ulja sjemenki nara vrlo popularna u kozmetici, dok su konjugirane linolne kiseline, zastupljene u manjem udjelu u ulju šafranke (*Carthamus tinctorius*, L. 1753), popularne u dodacima prehrani kojim pomažu kod pretilosti.

#### 1.5.1.2. Esencijalne i neesencijalne masne kiseline

Još jedna podjela masnih kiselina temeljena na mogućnosti tijela da proizvede masne kiseline razdvaja ih na esencijalne i neesencijalne. Glavna razlika između njih je što esencijalne masne kiseline tijelo ne može proizvoditi i moraju se konzumirati kroz hranu ili dodatke prehrani.



Neesencijalne masne kiseline tijelo može proizvesti, iako se i one mogu unositi na jednak način kao i esencijalne masne kiseline, odnosno još uvijek ih može pronaći u hrani (Choi, 2014).

- Esencijalne masne kiseline

Za ljude postoje samo dvije vrste esencijalnih masnih kiselina. To su alfa-linolenska kiselina, koja je vrsta omega-3 masne kiseline, i linolenska kiselina, koja je vrsta omega-6 masne kiseline. Tu je i treća kategorija esencijalnih masnih kiselina koje su zapravo poznate kao 'uvjetne' esencijalne masne kiseline jer su bitne samo na određenim razvojnim uvjetima ili u stanju bolesti. Primjeri 'uvjetnih' esencijalnih masnih kiselina su gama-linolenska kiselina, koja vrsta omega-6 masne kiseline, i dokozaheksenska kiselina, što je omega-3 masna kiselina. Omega-9 masne kiseline smatraju se ne-esencijalnim masnim kiselinama, jer se mogu proizvesti pomoću drugih masnih kiselina i ugljikohidrata (Choi, 2014).

Istraživanja su pokazala da su ravnoteža i omjer između tri vrste omega masnih kiselina jako važni. Mnogi faktori utječu na potrebu za omega kiselinama i utječu na količinu i omjer u kojem ih treba konzumirati. Općenito, količina omega-3 masnih kiselina bi trebala biti veća od količine omega-6 masnih kiselina.

Glavne funkcije esencijalnih masnih kiselina su održavanje funkcionalnosti stanične membrane, sudjelovanje u razvoju mozga i živčanog sustava, te pomaganje u proizvodnji hormona sličnih tvari (Meer, 2008). Oni također igraju važnu ulogu u prevenciji i razgradnji lošeg kolesterola u arterijama.

Omega 6 masne kiseline se nalaze u biljnom ulju, a smatra se da ovaj tip omega masnih kiselina pomaže u regulaciji krvnog protoka i razine kolesterola u krvi. Omega 3 masne kiseline imaju protuupalno djelovanje, a posebno blagotvorno djeluju na srce, kada upala stijenke krvnih žila uzrokuje aterosklerozu (Lands, 2005). Uglavnom se nalaze u ribljem ulju, kod riba kao što su tuna i skuša. Masne kiseline posebno sadržavaju bademi i orasi, ali važno ih je jesti u umjerenim količinama. Tamno, lisnato povrće, poput špinata, kelja i lana također sadrže omega-3 masne kiseline (Nichols, 2010).

- Neesencijalne masne kiseline

Neke neesencijalne masne kiseline također imaju određenu ulogu u organizmu i predstavljaju važnost za tijelo. Naravno, zasićene masti se smatraju neesencijalnim masnim kiselinama, jer one nisu u velikoj količini potrebne tijelu te upravo u tim velikim količinama mogu nanijeti ozbiljniju štetu organizmu. Predstavnik neesencijalnih masnih kiselina jest omega-9 masna kiselina, koja može utjecati na razinu kolesterola i sudjelovati u kontroli razine šećera u krvi. Budući da ljudsko tijelo može stvoriti omega-9 masne kiseline, nema potrebe da ih se dodatno uključuje u prehranu.

### 1.5.2. Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline se nazivaju tako jer ne sadrže dvostruke (kovalentne) veze ili druge funkcionalne skupine u molekularnom lancu. Sam pojam "zasićen" se odnosi na vodik koji se u maksimalnom mogućem broju veže na ugljikove atome u lancu (osim kod karboksilne skupine -COOH). Drugim riječima, zato što je ugljik 4-valentan, na svaki atom ugljika vežu se druga dva atoma ugljika i po dva atoma vodika, osim na drugom kraju lanca masne kiseline gdje je karboksilna skupina -COOH (a taj se kraj lanca naziva omega -  $\omega$ ) i gdje se vežu tri atoma vodika (CH<sub>3</sub>-) (IUPAC, 1997).

Zasićene masne kiseline tvore ravne lance atoma i kao rezultat toga mogu se zgusnuto skladištiti u organizmu, dopuštajući veću količinu energije po jedinici volumena. Masno tkivo čovjeka i životinja sadrži velike količine dugolančanih zasićenih masnih kiselina.

Skraćeni opisni naziv masnih kiselina sadrži samo broj atoma ugljika i broj dvostrukih veza u njima (npr. C18:0 ili 18:0 - stearinska kiselina - sadrži 18 atoma ugljika i 0 dvostrukih veza između atoma ugljika, dok C18:1 - oleinska kiselina - sadrži osim 18 atoma ugljika i jednu dvostruku vezu i zato je ona nezasićena masna kiselina) (IUPAC, 1997).

Primjeri zasićenih masnih kiselina:

- Maslačna kiselina (butanska): CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH ili C4:0
- Kapronska kiselina (heksanska): CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH ili C6:0

- Kaprilna kiselina (oktanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$  ili C8:0
- Kaprinska kiselina (dekanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$  ili C10:0
- Laurinska kiselina (dodekanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$  ili C12:0
- Miristinska kiselina (tetradekanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$  ili C14:0
- Palmitinska kiselina (heksadekanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$  ili C16:0
- Stearinska kiselina (oktadekanska):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$  ili C18:0
- Arahidska kiselina (eikosanoidna):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$  ili C20:0
- Behenijska kiselina (dokozanoidna):  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$  ili C22:0

## 1.6. Kiselost

Kratkolančane karboksilne kiseline kao što su mravlja i octena kiselina mogu se miješati s vodom i disocirati kako bi tvorile vrlo jake kiseline. Ali, kako se kompleksnost kiseline povećava, a lanac molekule kiseline produljuje, tako se ubrzano smanjuje topivost kiselina.

I one masne kiseline koje nisu topive u vodi topive su u toplom etanolu i mogu se titrirati ili neutralizirati otopinom natrijeve ili kalijeve lužine, uz fenolftalein kao indikator. Promjena boje indikatora ukazuje na točku neutralizacije slobodnih masnih kiselina. Ovu analizu rabimo kako bi se odredio udio slobodnih masnih kiselina u masnoći, tj. udio hidroliziranih triglicerida i obično se izražava kao "ukupna kiselost" (Stryer. 2011).

## 1.7. Međusobno djelovanje masnih kiselina

Masne kiseline reagiraju kao i svaka druga karboksilna kiselina (esterifikacija i reakcija kisele baze). Redukcijom masnih kiselina dobivaju se masni alkoholi.

Nezasićene masne kiseline mogu biti izložene hidrogenaciji kako bi se biljna ulja pretvorila u margarine (i na taj način produljio vijek trajanja prehrambene namirnice).

Djelomičnom hidrogenacijom nezasićene masne kiseline prelaze iz *cis* stanja u *trans* oblik.

## **1.8. Slobodne masne kiseline**

Masne kiseline mogu biti povezane ili pridružene drugim molekulama kao što su trigliceridi ili fosfolipidi. Masne kiseline koje nisu povezane s takvim molekulama nazivamo slobodne masne kiseline. One nastaju cijepanjem triglicerida na početne komponente, a to su masne kiseline i glicerol. Slobodne masne kiseline su važan izvor energije za mnoga tkiva jer mogu dostaviti relativno velike količine ATP-a. Gorivo za stanice može biti glukoza ili masne kiseline. Veći broj tipova stanica daju prednost masnim kiselinama (stanice srca, mišića) budući da je njihova količina u organizmu otprilike uvijek ista, dok s druge strane razina šećera varira. S druge strane, mozak ne može koristiti kiseline, već koristi glukozu ili ketonska tijela (ketonska tijela se stvaraju u jetri kroz metabolizam masnih kiselina za vrijeme gladovanja ili za vrijeme niskog unosa ugljikohidrata) (Stryer, 2011).

## **1.9. Sinteza i beta-oksidacija masnih kiselina**

### **1.9.1. Sinteza masnih kiselina**

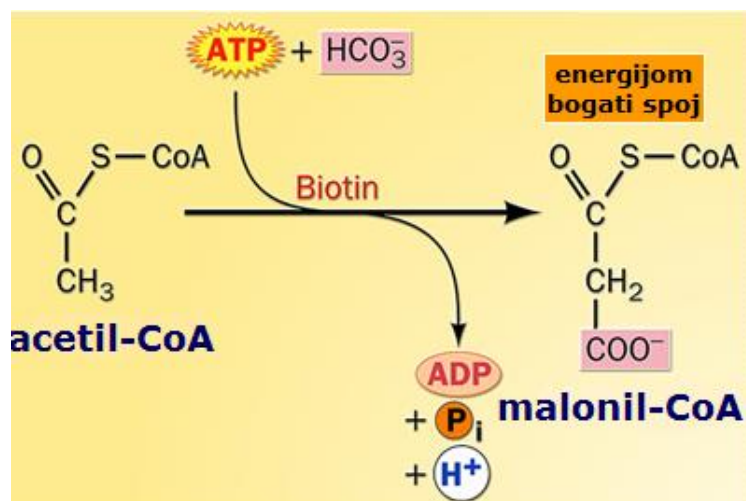
Sinteza masnih kiselina odvija se u citosolu stanice

Kod životinja se odvija u:

- jetri
- masnom tkivu
- središnjem živčanom sustavu
- mliječnim žlijezdama za vrijeme laktacije

Kod biljaka se odvija u plastidima.

Preteča u sintezi masnih kiselina je acetil-CoA. Citosolni acetil-CoA iz kojeg se sintetiziraju masne kiseline potječe iz procesa glikolize, a može potjecati iz mitohondrija gdje se prenosi u obliku citrata. Acetil-CoA i oksaloacetat prenose se iz mitohondrija u citosol na račun ATP-a. Odlučujući korak u sintezi masnih kiselina je karboksilacija (aktivacija) acetil-CoA (Slika 6) u malonil-CoA (Lehner, 1993).

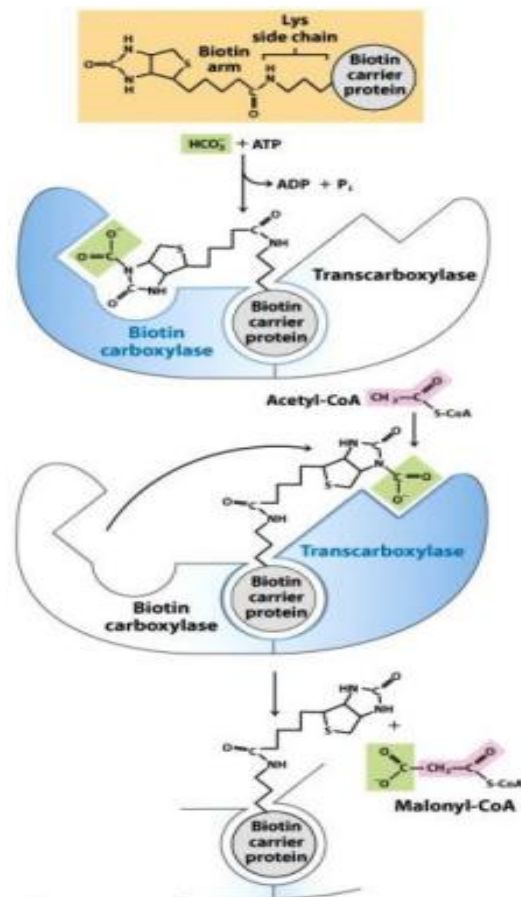


**Slika 6. Karboksilacija (preuzeto i prilagođeno s [www.perpetuum-lab.com](http://www.perpetuum-lab.com))**

U eukariota sintezu masnih kiselina katalizira sintaza masnih kiselina. Njenu reduktivnu snagu predstavlja NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat).

Sintaza masnih kiselina je multienzimski kompleks koji se sastoji od multifunkcionalnih proteina, u kojima su različiti enzimi kovalentno povezani u jedan polipeptidni lanac. Prednosti takve konformacije su koordinirana sinteza i visoka stabilnost. Sintaza masnih kiselina je kompleks enzima koji katalizira sve reakcije potrebne za sintezu masnih kiselina.

Bitan enzim koji također sudjeluje u sintezi masnih kiselina je acetil-CoA karboksilaza koja katalizira prijenos karboksilne skupine na acetil-CoA (Lehner, 1993). Acetil-CoA karboksilaza (Slika 7) ima tri funkcionalna dijela: nosač biotina (sivo), biotin karboksilazu (aktivira  $\text{CO}_2$  tako da ga veže na biotin, a za ovu reakciju potreban je i ATP), te transkarboksilazu koja prenosi aktivirani  $\text{CO}_2$  s biotin karboksilaze u aktivno središte transkarboksilaze. U svakom koraku reakcije, aktivni enzim obojan je plavo.



**Slika 7. Acetil-CoA karboksilaza (preuzeto i prilagođeno s [www.biochemistry.com](http://www.biochemistry.com))**

Koraci u sintezi masnih kiselina:

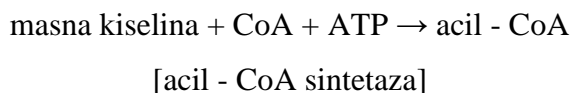
1. Sinteza masnih kiselina započinje karboksilacijom acetil-CoA čime on postaje malonil-CoA u reakciji koju katalizira acetil-CoA karboksilaza.
2. Nakon te reakcije acetil-CoA i malonil-CoA prelaze u acetil-ACP i malonil-ACP u reakcijama koje kataliziraju acetil-transacilaza i malonil-transacilaza.
3. Sljedeća reakcija je reakcija kondenzacije acetil-ACP i malonil-ACP pri čemu nastaje acetoacetyl-ACP. Enzim koji sudjeluje u toj reakciji naziva se acetil-malonil-ACP-kondenzirajući enzim.
4. Nakon toga dolazi do redukcije acetoacetyl-ACP pri čemu nastaje D-3- hidroksibutiril u reakciji koju katalizira beta-ketoacil-ACP-reduktaza.

5. Zatim dolazi do dehidracije D-3-hidroksibutirila čime on postaje krotonil-ACP. Enzim koji katalizira tu reakciju naziva se beta-hidroksiacyl-ACP-dehidrogenaza.

6. Zadnja reakcija je redukcija krotonil-ACP u butiril-ACP u reakciji koju katalizira enoil-ACP-reduktaza.

### 1.9.2. Beta oksidacija masnih kiselina

Masti su, u kemijskom značenju te riječi, trigliceridi. To znači da su na trovalentni alkohol glicerol vezane masne kiseline od 12 pa na više ugljikovih atoma (najčešće 16-18 C atoma). Trigliceridi ulaze u sastav fosfolipida i glikolipida, te služe kao metaboličko gorivo. Međutim, da bi ih mogli koristiti kao metaboličko gorivo prvo se moraju pocijepati esterske veze u trigliceridima, uz djelovanje enzima lipaze, čime dobijemo glicerol i masne kiseline (Lehner 1993). Glicerol je preteča za sintezu ugljikohidrata, te ide u glukoneogenezu. Masne kiseline vežu se na apolipoproteine koji ih odnose u citoplazmu masnih stanica gdje se oslobađaju i aktiviraju (Lehner, 1993).



Nakon toga ih kratki peptidni lanac - karnitin - odnosi u matriks mitohondrija gdje započinje njihova razgradnja ili beta-oksidacija.

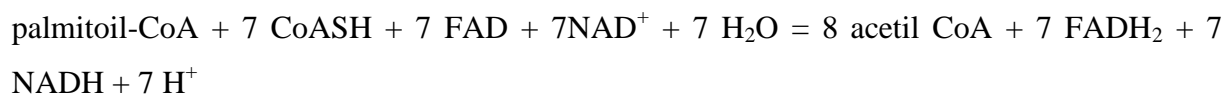
Razgradnja masnih kiselina se još naziva i "β-oksidacija". Mjesto razgradnje jest matriks mitohondrija, a nosač aktivirane acilne skupine: koenzim-A (HS-CoA). Oksidansi koji sudjeluju u takvom procesu su  $\text{NAD}^+$  i FAD, a produkti:

- masne kiseline s parnim brojem C-atoma: acetyl-CoA
- masne kiseline s neparnim brojem C-atoma: acetyl-CoA i propionil-CoA

Razgradnja masti:

1. Prvi korak u razgradnji masnih kiselina je oksidacija acil-CoA uz djelovanje enzima acil-CoA dehidrogenaze čime on prelazi u enoil-CoA.
2. Zatim dolazi do hidratacije nastalog enoil-CoA usljed čega on postaje  $\alpha$ -hidroksi acil-CoA uz djelovanje enzima enoil - CoA hidrataze.
3. Nakon toga dolazi do ponovne oksidacije, ali ovaj puta  $\alpha$ -hidroksi acil-CoA čime on postaje ketoacil-CoA. Reakciju katalizira L-3-hidroksi acil dehidrogenaza.
4. Zadnji korak u razgradnji masti je cijepanje ketoacil-CoA pomoću tiolne skupine čime dobijemo acetil-CoA i acil-CoA skraćen za 2 C atoma. Katalizator je beta-ketotioliza.

Stehiometrija oksidacije palmitata



Za aktivaciju palmitata utroše se 2ATP.

ISKORIŠTENJE:

$$2 \text{ ATP} + 108 \text{ ATP} = 106 \text{ ATP}$$

- $\Delta G^\circ$  (hidroliza ATP):  $106 \times (-30,5 \text{ kJ}) = -3233 \text{ kJ/mol}$
- $\Delta G^\circ$  (oksidacija palmitinske kiseline) =  $-9800 \text{ kJ/mol}$
- Efikasnost oksidacije masnih kiselina: 33%

#### 1.9.2.1. Beta oksidacija u peroksisomima

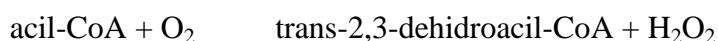


Osim u mitohondrijima, beta-oksidacija može se dovijati i u peroksisomima. Do tog slučaja dolazi kada je duljina lanaca masnih kiselina vrlo velika. Kod peroksisomske beta-oksidacije, ne dolazi do potpune razgradnje lanca masne kiseline, već se taj proces zaustavlja na oktanilu-CoA.

Postoji nekoliko bitnih razlika između mitohondrijske i peroksisomske beta-oksidacije, a jedna od njih je i korištenje različitih enzima, budući da je poznato da su enzimi kao takvi biokemijske molekule koje kataliziraju samo one procese koji su svojstveni njima i u rijetko kojim slučajevima kataliziraju više različitih kemijskih reakcija (Liang, 2016).

Posebna peroksisomalna karnitin acil transferaza (umjesto uobičajene acil transferaze I i II) prenosi aktivirane masne kiseline.

Unutar peroksisoma, aktivirane masne kiseline (acil-CoA) čvrsto su vezane za matriks proteina (Van Veldhoven, 1986). Njih oksidira prvi enzim flavoprotein acil-CoA oksidaza koja katalizira nastanak dvostruke veze po slijedećoj formuli:



Valja napomenuti da ova reakcija oksidacije nije vezana za proizvodnju ATP-a. Pri peroksisomnoj beta-oksidaciji akseptori elektrona nisu NAD<sup>+</sup> i FAD, već molekula kisika (O<sub>2</sub>), koja redukcijom prelazi u vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tako da se većina energije u stvari gubi u obliku topline. Pošto je vrlo toksičan za stanicu, vodikov peroksid vrlo brzo razgrađuje enzim katalaza.

Drugu reakciju odvajanja acetila CoA od preostalog acil CoA katalizira enzim β-ketotiolaza, koja je po afinitetu prema supstratima različita od mitohondrijske tiolaze.

Beta-oksidacija je vrlo važan metabolički proces kod biljnih stanica. Biljke ne koriste ovaj proces za dobivanje energije, već za sintezu bitnih metaboličkih spojeva kao glukoze, saharoze i dr. Beta-oksidacija kod biljaka najviše se odvija u stanicama listova i u sjemenu u organelima koji se u ovom slučaju nazivaju glioksisomi.

#### **1.10. Masne kiseline kod riba**

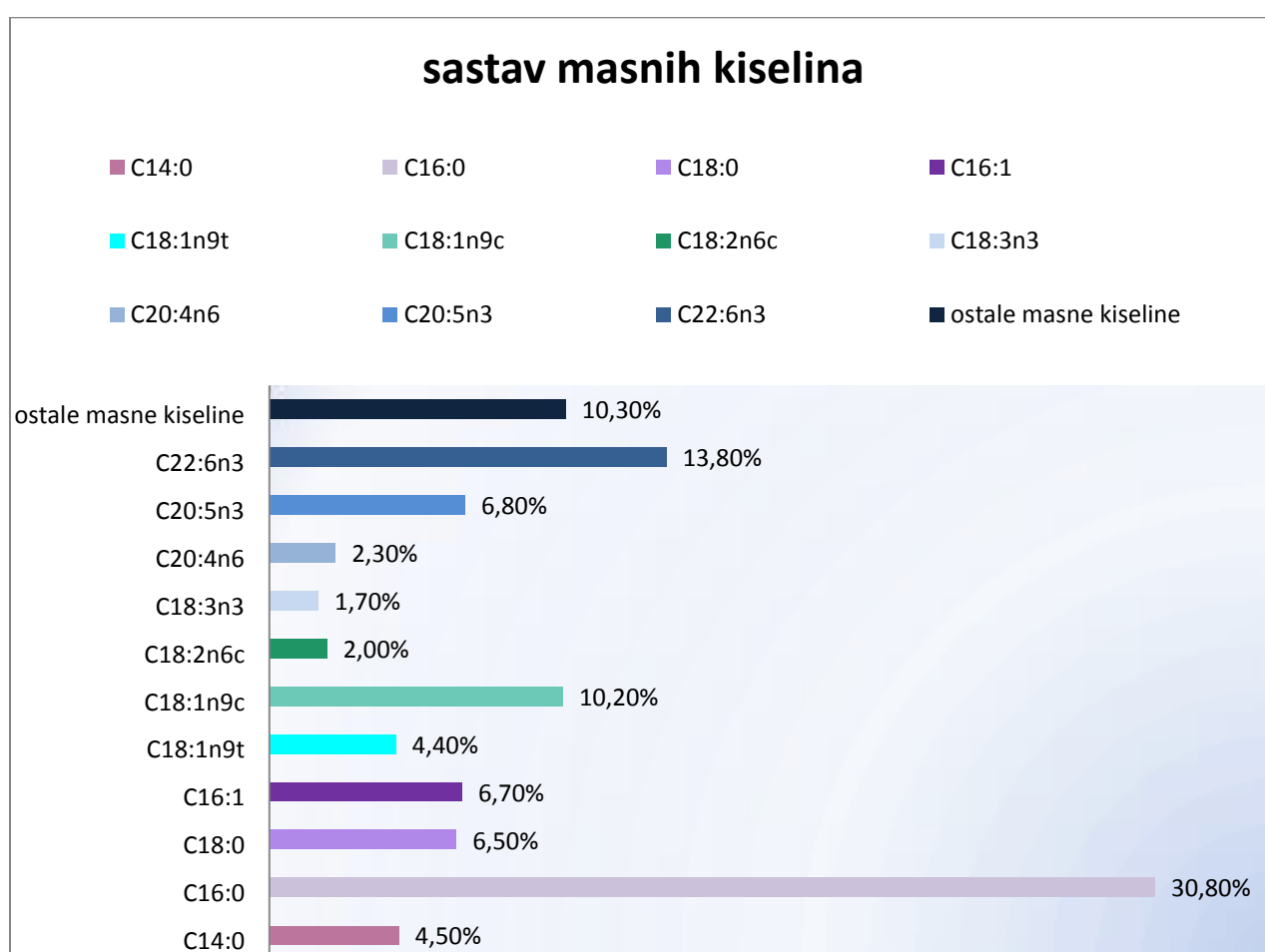
Kakvoća ribljeg mesa se, između ostalog, vrijednuje prema količini masti i sastavu masnih kiselina. Meso riba je posebice varijabilno u pogledu količine masti, koja i jest parametar za razvrstavanje riba u kategorije i to: nemasne – do 3% masti, kao npr. štika i bakalar, srednje masne – do 8% masti, poput šarana i deverike i masne s količinom masti većom od 8% kao što su som, haringa i skuša. Količina masti u mesu riba varira od 0,7% do 20%, a ponekad i više. Isto tako, masti u tijelu riba nisu ravnomjerno raspoređene. Riba se na osnovi raspodjele masti dijeli na plavu i bijelu. Plava riba pohranjuje masti u masnim stanicama po cijelom tijelu, a bijela u jetru i donekle trbušnu šupljinu.

Udio masti u bijeloj ribi je nizak, napose u mesu gdje čini oko 1%, a od toga oko 90% čine strukturalne masti ili fosfolipidi (Young, 2009). Meso ribe je male energetske vrijednosti u odnosu na meso sisavaca koje se koristi u prehrani, no nutritivno je njegovo značenje veliko. Nutritivna važnost u konzumaciji ribe najvećim dijelom je povezana s povoljnim profilom masnih kiselina. Riblja se mast većim dijelom sastoji od nezasićenih masnih kiselina pa se stoga može usporediti s biljnim mastima. Kao jedan od značajnih sastojaka ribe navode se omega-3 masne kiseline. Posebno zanimanje za njih počelo je 1970. godine, nakon otkrića danskih liječnika da Eskimi na Grenlandu, unatoč masnoj prehrani, rjeđe obolijevaju od kardiovaskularnih bolesti, a smrtnost je niža od prosječne. Prehrana Eskima se temeljila na hrani iz mora (Beare-Rogers, 2001).

Masti riba se, dakle, po sastavu razlikuju od masti toplokrvnih životinja. Riblja mast je uglavnom sastavljena od dugolančanih (14–22 C atoma) te nezasićenih masnih kiselina (60-84%) i to su u morske ribe oko 88% visoko nezasićene masne kiseline s 5 ili 6 dvostrukih veza (Turchini, 2012), a što ih čini posebice podložnim oksidacijskim procesima i kvarenju (Young, 2009). Naravno, usporedbom različitih studija očekivane su varijacije, budući i da sastav masti i sadržaj lipida ovise o sezoni ulova, veličini, spolnoj zrelosti i geografskoj lokaciji. Od zasićenih su masnih kiselina u mastima riba zastupljene palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), miristinska (C14:0), a samo kod nekih vrsta riba u maloj koncentraciji i laurinska masna kiselina (C12:0).

Mononezasićene masne kiseline su u najvećem postotku oleinska (C18:1) i palmitoleinska (C16:1). Osim njih, u lipidima riba od mononezasićenih masnih kiselina prisutne su još i miristoleinska (C14:1), eikozaenska (C20:1), eručna (C22:1n9). Posljednje dvije masne

kiseline se u najvećoj koncentraciji nalaze u mastima morskih riba. Od omega-6 masnih kiselina u lipidima riba, uz najznačajnije linolnu (C18:2n6) te arahidonsku (AA, C20:4n6), analizom se mogu utvrditi i eikozadienska (C20:2n6), eikozatrienska (C20:3n6), dokozatetranska (C22:4n6) i dokozapentenska (C22:5n6). Najvažniji članovi omega-3 skupine su uz  $\alpha$ -linolensku kiselinu (C18:3n3), eikozapentanska (EPA, C20:5n3) i dokozaheksanska (DHA, C22:6n3) masna kiselina (Slika 8). Osim njih, u lipidima riba od omega-3 masnih kiselina utvrđene su još i stearidonska (C18:4n3), eikozatrienska (C20:3n3), eikozatetraenska (C20:4n3) (Young, 2009).



**Slika 8. Prosječni sastav najzastupljenijih masnih kiselina u mesu morskih riba Mediterana (Prilagođeno prema Murray i Hager, 2015.)**

Murray i Hager, 2015, su istraživali udio masti i sastav masnih kiselina u desetak ribljih vrsta s Mediterana, od kojih se većina nalazi i kod nas na Jadranu. Identificirano je 25 masnih kiselina od C12 do C22:6n3 i uspoređeno među vrstama. Dominacija SFA je uglavnom

posljedica visoke razine palmitinske kiseline koja čini 70% ukupnih zasićenih kiselina. Oleinska kiselina je dominantna među MUFA u lipidima mnogih morskih riba s udjelom oko 60-75% mononezasićenih masnih kiselina. Prema navedenom istraživanju neke ribe pokazuju i visoke koncentracije C18:1n9 trans masne kiseline koje u usporedbi s cis imaju nepoželjan učinak za ljudsko zdravlje. Sve analizirane vrste sadržavale su veći udio omega-3 od omega-6 masnih kiselina, što rezultira pogodnim omega-6/omega-3 omjerom ( $<4$ ) iako s velikom raznolikosti među vrstama. Iako su ribe glavni prehrambeni izvor visoko nezasićenih masnih kiselina, osobito EPA i DHA, nisu sposobne sintetizirati dugolančane omega-3 PUFA, nego ih stječu na način da se hrane mikroorganizmima kao što su alge ili manjim ribama koje jedu PUFA-sintetizirajuće mikroorganizme. Posljedično, udio omega-3 PUFA u mesu ribe ovisi o ishrani (Murray i Hager, 2015).

### **1.11. Jeguljke (*Anguilliformes*)**

Jeguljke (*Anguilliformes*) su red riba, koji, prema dijelu autora ima 4 podreda, 19 porodica, 110 rodova i oko 600 vrsta.

Većina jeguljki su noćni grabežljivci. Tijelo jeguljki je dugačko i zmijoliko. Po tijelu imaju male ljuske. Prema repu im je tijelo spljošteno, a leđna i podrepna peraja se protežu od gotovo polovice tijela te spajaju u repnu peraju koja završava šiljato. Koža im je sluzava, a oči malene. Čeljust im je puna malih oštih zubića. Leđa su im tamnozeleni, a trbuh srebrnast. Mužjak naraste do 50 cm, a ženka do 150 cm (do 5 kg težine). Zimi se jegulje zavuku u mulj, i tu prezime do proljeća dok se voda ne zagrije. Većina vrsta jeguljki živi u tropskim i suptropskim morima, i to po obalnim vodama, koraljnim grebenima ali i u ekstremnim dubinama. Generalno se može reći da jeguljke preferiraju pliću i mirniju vodu (i vole živjeti po rupama) ali neke vrste žive na velikim dubinama (kao porodica Synbranchidae, koja živi na 4.000 metara, a neke su pak vrlo dobri plivači (porodica Nemichthyidae) - i to na dubinama od 500 metara.

Sistematika

Filogenetički srodnički odnosi jeguljki još nisu potpuno razjašnjeni. Često ih se dijeli na tri, ali i četiri podreda, a ovisno o autoru ili izvoru na 15 pa do 25 porodica. Ova sistematika preuzeta je iz FishBase i dijeli se na četiri podreda podijeljenih na 15 porodica (dodane su i porodice prema ITS-u i Sistema Natura 2000).

- Podred Anguilloidei
  - riječne jegulje (Anguillidae), često i prave jegulje ili slatkovodne jegulje
  - Chlopsidae
  - Heterenchelyidae
  - Moringuidae
  - Muraenidae
  - Myrocongridae
- Podred Congroidei
  - Colocongridae
  - Congridae (Ugori)
  - Derichthyidae
  - Muraenesocidae
  - Nettastomatidae
  - Ophichthidae
- Podred Nemichthyoidei
  - Nemichthyidae
  - Serrivomeridae
- Podred Synphobranchoidei
  - Synphobranchidae
    - Uključujući: Dysommidae, Nettodaridae i Simenchelyidae

Po nekim klasifikacijama, porodica Cyematidae je uključena u Anguilliformes, ali po klasifikaciji u FishBase system, ova porodica je uključena u red Saccopharyngiformes.

Red: *Anguilliformes*

Podred: *Aguillidae*

Vrsta: *Anguilla anguilla*

**1.11.1. Jegulja** (narodni nazivi: jegulja, angula, bižot, uklica, pujoglavica; lat. *Anguilla anguilla*) riba je iz porodice riječnih jegulja (lat. *Anguillidae*). Ova vrsta je jedina vrsta iz svoje porodice koja nastanjuje našu obalu. Može živjeti jako dugo, do 88 godina, a naraste do 133 cm duljine i više od 6,5 kg težine. Izgled jegulje je zmijolik, ima dugo, izduljeno tijelo, leđna peraja započinje daleko iza glave, rep se završava trakasto, spojem leđne i trbušne peraje. Donja čeljust jegulje je malo izduženija od gornje, oči se nalaze na samom vrhu glave, odmah poviše usta. Boja jegulje je zelenkasta ili sivkasto smeđa, a donji dio je žućkast. Obavijene su slojem sluzi koji jegulji omogućava provlačenje kroz gusto raslinje u rijekama, a također i puzanje po obali i mulju pri niskom vodostaju. Hrane se jajašcima riba, ribljom mlađi, crvićima, puževima, ali i jajašcima žaba, malim punoglavcima, insektima, itd. Jegulja je većinom noćno stvorenje, kada izlazi iz skrovišta u potrazi za hranom, premda treba naglasiti da ni po danu neće odbiti zalogaj ako se on približi njenom skloništu. Jegulje koje žive u Europi nisu spolno zrele, a spolno sazrijevanje se dešava u dobi 6-30 godina, ovisno o spolu i području. Boja im se tada mijenja u srebrnkastu s tamnijim bokovima, povećavaju im se nosnice i oči, produljuje im se čeljust, te odlaze u more. Prestaju se hraniti, te im se crijeva skraćuju i ostavljaju više mjesta u utrobi za spolno zrele gonade. Počinju putovanje prema Sargaškom moru, a putem se skupljaju u jata. Putovanje traje i po godinu dana, a po dolasku u Sargaško more, jegulje se mrijeste i ugibaju. Mriještenje se odvija krajem zime i početkom proljeća, na većim dubinama, od 400 - 2500 m. Larve putuju natrag prema Europi koristeći Golfsku struju, a put traje 7-11 mjeseci, ponekad i do 3 godine. Putem se razvijaju u male bočno spljoštene i posve prozirne zmijice. Dolaskom na odredište, mijenjaju izgled u male jegulje i ulaze u slatku vodu, tj. na ušća i u rijeke.

Kod nas, jegulja (Slika 9) je najpoznatija na ušću Neretve, gdje se razvio cijeli niz specijaliteta. Prilikom pripreme jegulju treba dobro termički obraditi jer njena krv sadrži ihtiokemotoksine.



**Slika 9. Jegulja (*Anguilla anguilla*), izvor slike: <http://www.arkive.org/european-eel/anguilla-anguilla/image-A22855.html>**

Red: *Anguilliformes*

Podred: *Muraneidae*

Vrsta: *Muraena helena*

**1.11.2. Murina žutošarka** je riba zmijolikog tijela dugačkog do 150 cm. Tijelo je sprijeda valjkasto, a straga bočno spljošteno. Površina je sluzava, bez ljusaka. Duž cijelih leđa, sve do analnog otvora neprekidno se proteže uska kožasta peraja. Glava i tijelo su u osnovi sive do sivo smeđe boje. Tijelo je prošarano žutim šarama, koje mogu biti vrlo različitog oblika, veličine i gustoće. Na glavi ima 2 para nosnih otvora. Prednji nosni otvori su uvijek cjevastog oblika. Stražnji nosni otvori nalaze se između očiju. U čeljustima i na nepcu ima snažne i šiljaste zube.

Danju se najčešće skriva u rupama i pukotinama stijena. Najaktivnija je noću, kada u potrazi za plijenom izlazi iz skloništa. Murina (Slika 10) je stanovnik Jadranskog i Sredozemnog mora, istočnog Atlantika od Engleske do Senegala, Azorskih i Kanarskih otoka, Madeire.

Na Jadranu je najčešća u srednjoj i južnoj Dalmaciji, posebno južno od otoka Hvara. U sjevernom Jadranu se rjeđe nalazi.

Murini je moguće prići blizu, ako je se posebno ne uznemirava. Tada će otvaranjem usta i pokazivanjem oštrih zuba nastojati dati do znanja da se držimo podalje od nje. Ugriz joj je vrlo snažan, bolan i opasan. Mjesto ujeda godinama ostaje otvrdnuto. Tijelo joj je prekriveno otrovnom sluzi. Iako se hrani ribama, glavonošcima i rakovima, dozvoljava da joj kozice čiste tijelo i čeljust.



**Slika 10. *Muraena helena*, izvor slike:**

**<http://www.colapisci.it/PescItalia/pisces/Anguilliformes/Murenidae/murena.htm>**

### **1.12. Cilj istraživanja**

Ovo istraživanje po prvi puta prikazuje analizu kvalitativnog i kvantitativnog sastava lipida u murine (*Muraena helena*) za koju ovi podatci ne postoje kao niti za cijelu porodicu *Muraenide*, čiji je murina holotipski predstavnik. Značaj rezultata je u tome da daje osnovnu sliku u razlikama sastava lipida u *Muraenida* i ostalih jeguljastih riba, primjerice jegulje. Značaj rezultata je u tome jer esencijalne masne kiseline predstavljaju važnu fiziološku komponentu u ljudskoj prehrani i fiziologiji, a na osnovu rezultata moguće je procijeniti potencijal *Muraenida* kao izvora esencijalni masnih kiselina za čovjeka.



## **2. MATERIJALI I METODE**

Svi postupci na životinjama napravljeni u ovom radu izvršeni su u skladu s etičkim standardima institucionalnog i / ili nacionalnog istraživačkog odbora i u skladu s 63/2010 deklaracijom Direktive EU-a i njenih kasnijih izmjena i dopuna. Istraživanje je provedeno u skladu s EU i Hrvatskim nacionalnim pravilnikom o životinjama zakona NN55 / 13.

### **2.1. Prikupljanje uzoraka riba**

Sve životinje ( $n = 10$  / vrsta) su anestetizirane i žrtvovane prije prikupljanja uzoraka. Biokemijske analize svake pojedine ribe napravljene su u triplicatu tako da je provedeno ukupno 60 analiza za svaki biokemijski parametar. Životinje su prikupljene u skladu s Nacionalnom zakonom o ribarstvu u RH i EU.

Murine i drugi uzorci su prikupljeni na istom putovanju i na istom mjestu na Jadranu (42.761019, 17.765090), Elafitskim otocima u blizini Dubrovnika, na dubini od 5-10 m. Detalji su dani Đikić i sur. 2013. Ribe su ulovljene u rujnu, kako bi se osiguralo analiziranje riba pod približno jednakim uvjetima i kako bi se osigurala reprezentativnost uzoraka. Uzimajući u obzir noćne navike vrsta, parangali su postavljeni u 03:00 ujutro, a prikupljeni dva sata kasnije. Sve su ribe bile zdrave i vrlo agilne (aktivno agresivne).

Kako bi se osigurala ujednačenost između uzoraka za prikupljanje, riblje je ulje prikupljeno iz riba koje su bile slične duljine, u prosjeku  $\pm SD = 72.37 \pm 13.41$  cm, min 60,20 cm, max 93.20 cm, medijan 64.70. Europske jegulje su prikupljene u delti i ušću rijeke Neretve, na mjestu gdje ona ulazi u Jadransko more (43.033655, 17.551200), puni rast i dužina izabrani su za analizu srednje vrijednosti  $\pm SD = 58.17 \pm 12.56$ cm, min 41.50cm, max 74,00 cm, medijan 58.00.

Djelomični presjek repne regije svih uzoraka, oko 10 cm u duljinu od anusa, prema vrhu repa izoliran je iz svake pojedine ribe. Kost je uklonjena, a sa stražnji dio (mišićno tkivo, subdermalna masti i koža) je maceriran. Uzorci su uzeti iz ovog alikvota za sve analize i pohranjeni su na  $-80^{\circ}\text{C}$  u hermetički zatvorenim posudama do analize. Sve biokemijske analize detaljno opisane u sljedećim odjeljcima provedene su kao što je detaljno opisano u Varljen i sur. (2003).

## 2.2. Metode

- Sadržaj vlage

Sadržaj vlage se određuje u uzorku prosječne mase 1 g, standardnim postupkom sušenja na 105 ° C dok nije postignuta konstantna masa, a izračunata je kao:

$$\% \text{ vlage} = \text{gubitak mase} / \text{masa uzorka} * 100.$$

- Analiza pepela

Sadržaj pepela u uzorcima jegulje i murine je analiziran kao talog nakon spaljivanja u peći za žarenje (Gerhardt) na 550-600 ° C dok talog nije postao bjelkaste boje, a izračunat je kao:

$$\% \text{ Pepela} = \text{masa pepela} / \text{masa uzorka} * 100.$$

- Ekstrakcija ukupnih lipida

Ukupni lipidi su ekstrahirani iz uzoraka mišićnog tkiva prema metodi opisanoj u Varljen i sur. (2003). Smjesa otapala kloroform / metanol (2:1) doda se u uzorcima u omjeru od 20:1. Uzorci su centrifugirani 3 puta tijekom 15 minuta na 4000 okretaja u minuti. Između centrifugiranja se uzorci inkubiraju 1 h na + 4 ° C. Nakon toga se doda 4 ml 0,034%  $\text{MgCl}_2$  / g tkiva i inkubira preko noći na + 4 ° C. Gornji (vodeni) sloj se uklanja, a donji (organski) sloj se ispere otapalom koje čini kloroform: metanol (2:1) i smjesti se u staklenu posudu. Isparavanje donje faze omogućuje potpunu lipidnu frakciju. Otapalo je uklonjeno na rotacijskom isparivaču pod vakuumom na + 40 ° C. Ti ekstrakti, koji predstavljaju ukupne lipide su izvagani i opet otopljeni u maloj količini (1-2 mL) otapala koje sadržava kloroform: metanol (2:1). Dobiveni ekstrakt ukupnih lipida pohranjen je pri + 4 ° C do daljnje analize.

- Analiza masnih kiselina

Profil masnih kiselina u ukupnim lipidnim izolatima određen je plinskom kromatografijom uz pomoć odgovarajućih metil estera. Metilni esteri masnih kiselina su dobiveni kiselom metanolizom ekstrakta lipida dodavanjem 0,86 ml benzena i 1,00 ml BF<sub>3</sub> u metanolu. Korišten je kapilarno-plinski kromatograf Hewlett Packard HP 5890A opremljen plamenim ionizirajućim detektorom (FID).

Nepolarna kapilarna kolona HP Innowax umrežena polietilenglikolom (HP-5 30 m x 0,32 mm), koji sadrži 5% difenila i 95% difenil dimetilsiloksana, korištena je za analizu. Temperatura kolone je programirana za linerani porast od 4 ° C / min, od 150 do 210 ° C. Temperatura injektora i detektora su 250 ° C. Dušik se koristi kao noseći plin. Sve analize su dvostruko provedene. Metilni esteri masnih kiselina su identificirani usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja standardnih etil estera masnih kiselina (GLC 68B Nu-Check-prep, Inc., Elysian, Minnesota).

Relativni udio svake identificirane masne kiseline se automatski izračunava.

- Analiza proteina

Proteini su analizirani metodom po Lowryju, temeljenoj na reakciji bakrenih iona koordinativno vezanih za amino skupine peptidnih veza u proteinu i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline Tyr u proteinu sa Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa maksimumom apsorbancije pri 660 nm. Apsorbancije proteina su izmjerene na spektrofotometru, a koncentracije su im određene uz pomoć baždarnog dijagrama.

- Statistička analiza

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. STATISTICA12.0 je softver koji je upotrijebljen za analizu podataka. Homogenost varijacije testirana je Levine testom. OneWay ANOVA je korišten za testiranje i usporedbu razlika u biokemijskim parametrima i sastavu masnih kiselina. Za post hoc analize korišten je LSD test. Statističke razlike su postavljene na ( $p \leq 0.05$ ).

### 3. REZULTATI

Iz uzoraka tkiva riba murine i jegulje napravljena je analiza količine vlage, pepela i suhe tvari. Rezultati prikazuju prosječne vrijednosti analiza koje su izvedene trostruko za svaku jedinku. Pokazuju i istaknute razlike ( $p \leq 0.05$ ) u sastavu vlage, pepela i suhe tvari između dvije jeguljaste vrste. Kod jegulje je udio vlage i udio pepela manji nego kod murine, a udio suhe tvari veći. (Tablica 1.)

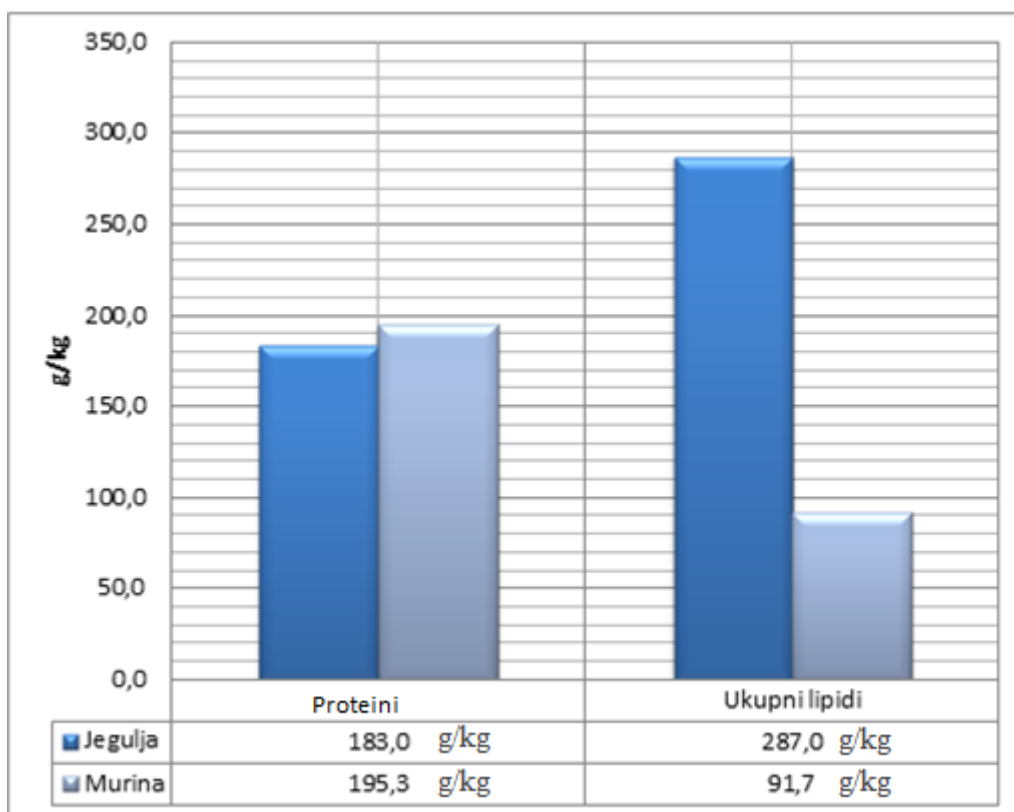
Tablica 1. Udjeli (g/kg) vlage, suhe tvari (organska tvar) i pepela (mineralne tvari) jegulje i murine.

(g/kg)	Jegulja		Murina	
	Srednja vrijednost	$\pm$ SD	Srednja vrijednost	$\pm$ SD
Vlaga	536.5	$\pm 5.5^b$	699.0	$\pm 39.7^c$
Suha tvar	463.5	$\pm 5.5^b$	301.0	$\pm 39.7^c$
Pepeo	14.9	$\pm 1.6^b$	20.8	$\pm 3.9^a$

<sup>a,b</sup> Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0.05$ ) između istraživanih vrsta.

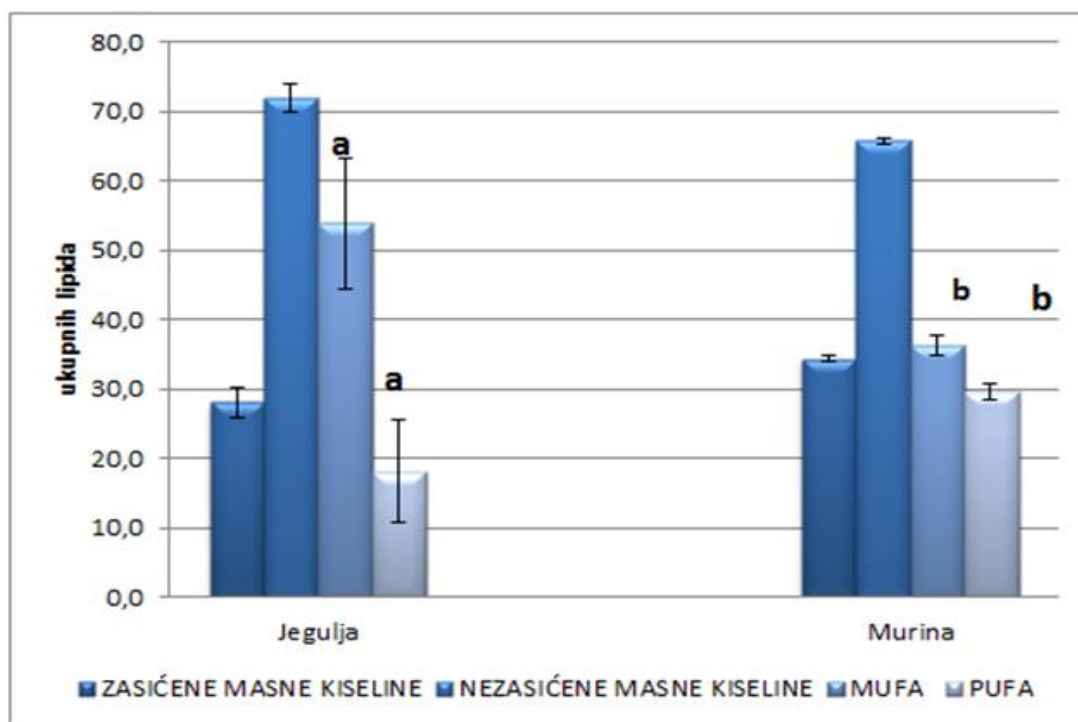
Kod uzoraka tkiva murine i jegulje u predjelu repa, analizirana je količina proteina i lipida. Pokazano je da sadrže gotovo istu količinu proteina, ali da jegulja ima više lipida u tkivu. Razlike na razini proteina nisu pokazivale velika odstupanja, dok na razini lipida postoje puno veće razlike. Radi se o tri puta većoj količini lipida kod jegulje, nego kod murine.

U usporedbi količine proteina i lipida, omjer je bio  $> 1$  kod murine i  $< 1$  kod jegulje (Slika 11).



**Slika 11. Udio proteina i ukupnih lipida u mišiću repa u jegulje i murine. (Lipidi analizirani u tkivu mišića plinskom kromatografijom)**

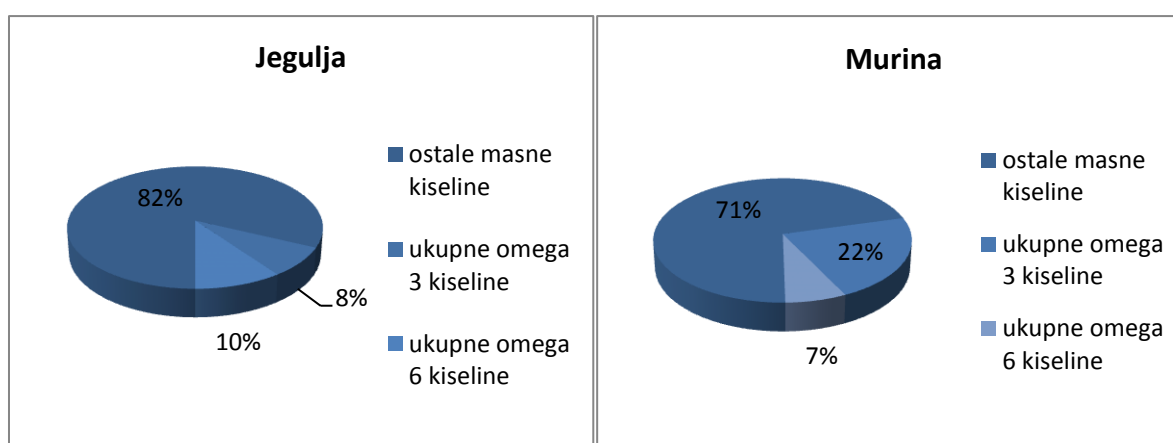
Specifičan omjer masnih kiselina pokazuje da je omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kod ove dvije vrste sličan, iako među njima postoje velike razlike u kvaliteti istih ( $p \leq 0.05$ ), budući da jegulja sadržava gotovo 2 puta veću količinu monozasićenih masnih kiselina, nego murina. Posljedično tome, jegulja ima nižu razinu polinezasićenih masnih kiselina u organizmu (Slika 12).



**Slika 12. Udio pojedinih skupina masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz intramuskularne masti jegulje i murine.**

<sup>a,b</sup> Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0.05$ ) između istraživanih vrsta.

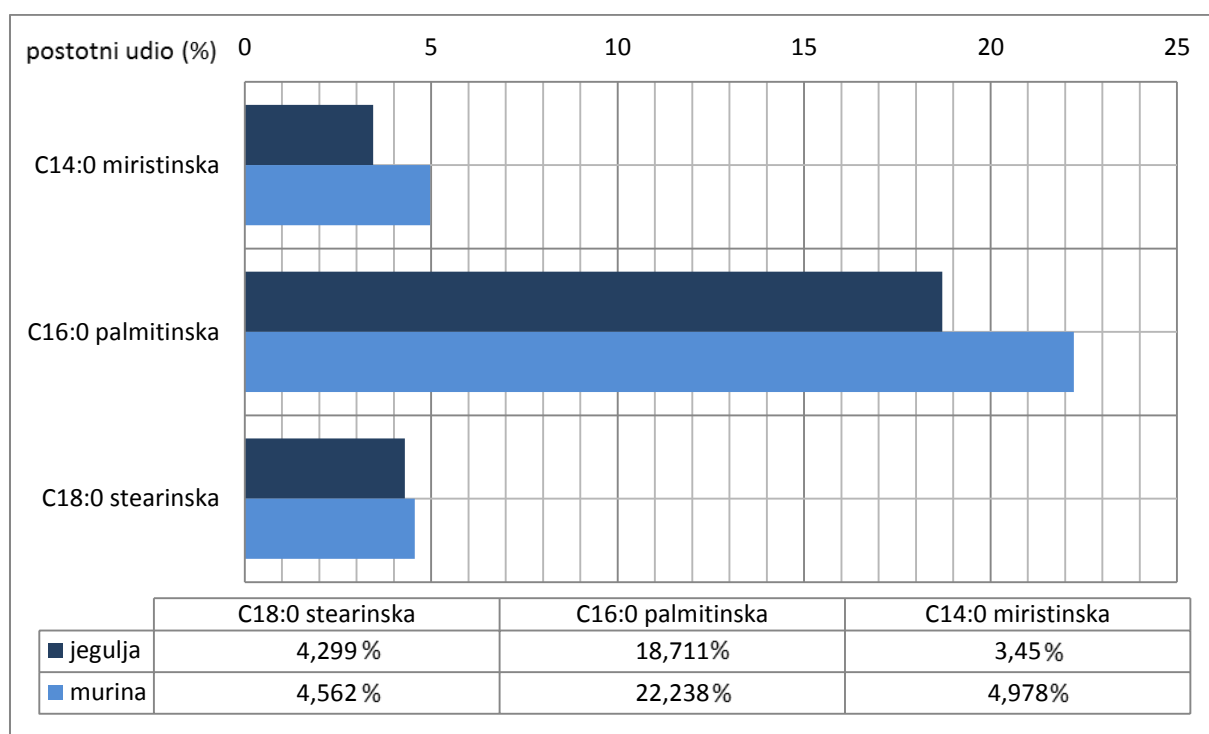
Nadalje, omjeri omega 3 i omega 6 masnih kiselina pokazuju da murina sadrži veće količine istih, i to u omjeru 3,14:1, dok jegulja u omjeru 0,88:1. Sličnost u rezultatima ukazuje omjer omega -3 / omega-6 masnih kiselina prikazan na Slici 13.



**Slika 13. Postotni udio  $\omega 3$  i  $\omega 6$  te ostalih skupina masnih kiselina u ukupnom sastavu masnih kiselina detektiranih u sastavu intramuskularne masti jegulje i murine.**

Budući da su pronađene razlike kod zasićenih i nezasićenih masnih kiselina i različitosti u sadržaju MUFA i PUFA, veće razlike su također pronađene i u količinama pojedinih masnih kiselina.

Udio zasićenih masnih kiselina pronađen je u sličnom omjeru i kod jegulje i kod murine. Najzastupljenije zasićene masne kiseline pronađene kod obje vrste jeguljki jesu miristinska (14:0), palmitinska (16:0) i stearinska (18:0). Murina sadržava sve navedene masne kiseline u nešto većem omjeru, nego jegulja (Slika 14).

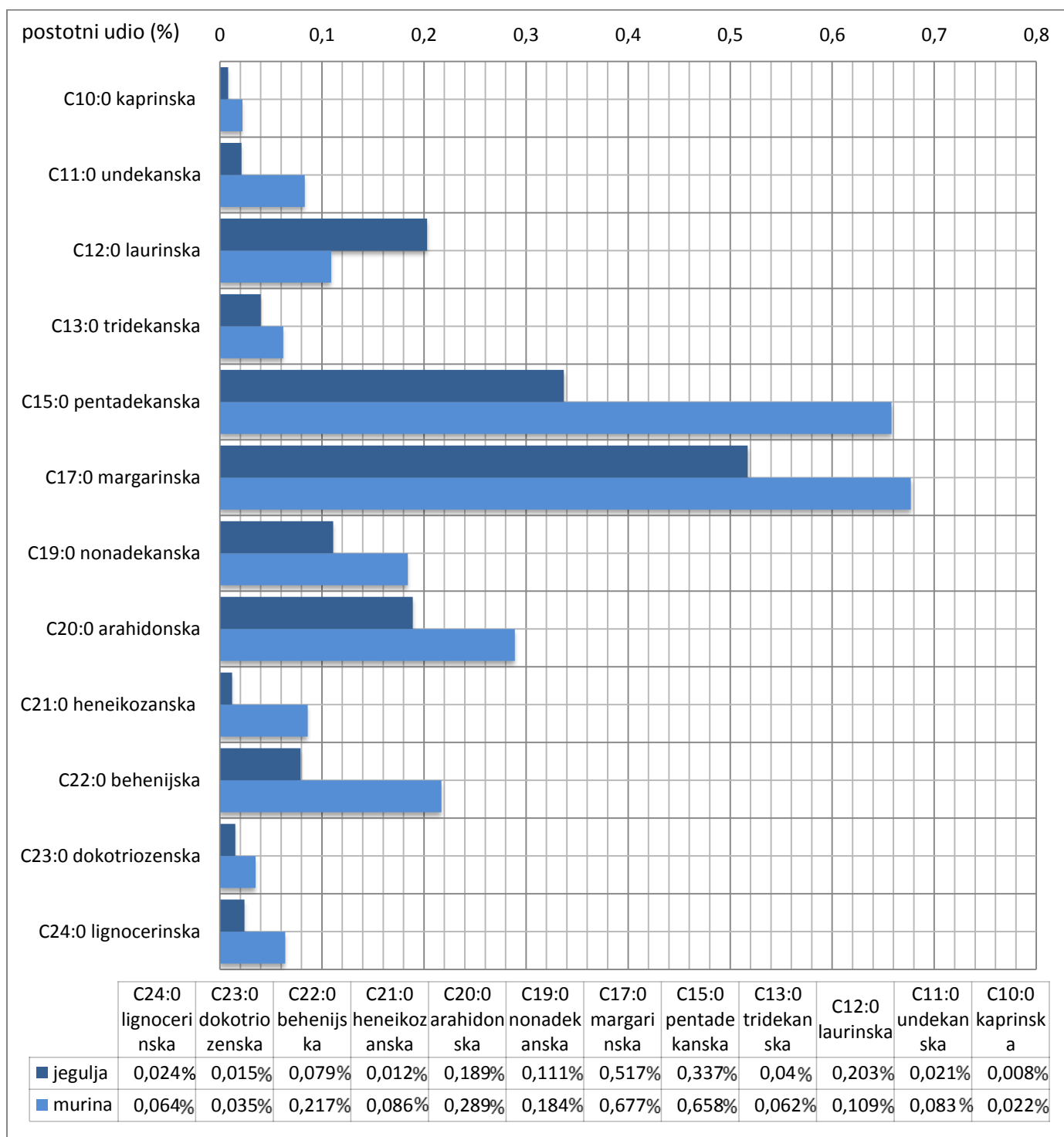


**Slika 14. Udio zasićenih masnih kiselina kod jegulje i murine. (Masne kiseline analizirane u tkivu mišića plinskom kromatografijom)**

Rezultati grafa izraženi su kao % udjeli u ukupnom sastavu masnih kiselina.

Osim miristinske, palmitinske i stearinske kiseline pronađene su i druge zasićene masne kiseline u nešto manjim količinama. Statistički gledano, zasićene masne kiseline pronađene u najmanjoj količini su kaprinska (10:0), heneikozanska (21:0), dokotriozenska (23:0) i lignocerinska (24:0). Ukupan udio ovih masnih kiselina pronađen je u većoj količini kod murine, nego kod jegulje. Sadržaj gotovo svih zasićenih masnih kiselina u nešto je većim količinama pronađen kod murine nego kod jegulje. Ove se dvije vrste jeguljki razlikuju i kada

je riječ o omjeru još jedne zasićene masne kiseline, a to je laurinska. Jedini predstavnik zasićenih masnih kiselina koji je zastupljeniji kod jegulje (Slika 15).



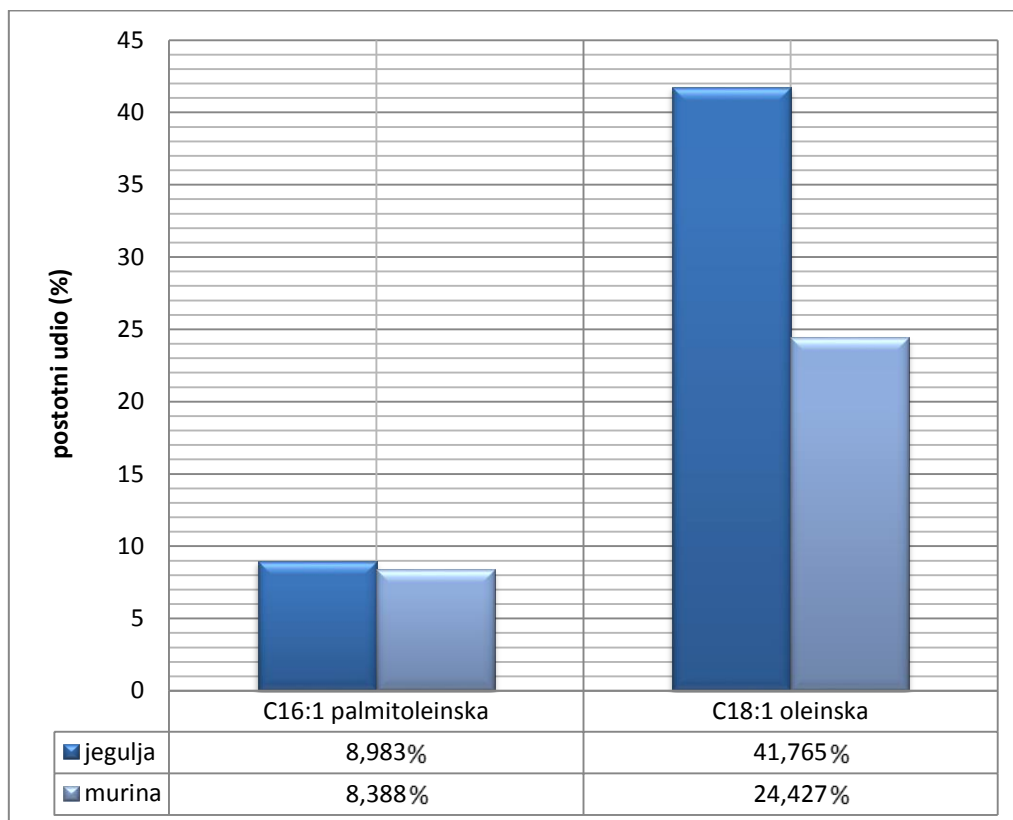
**Slika 15. Sastav i kvalitativni postotni udjeli zasićenih masnih kiselina kod jegulje i murine.**



**(Sastav masnih kiselina je analiziran u tkivu mišića plinskom kromatografijom)**

Rezultati grafa izraženi su kao % udjeli u ukupnom sastavu masnih kiselina.

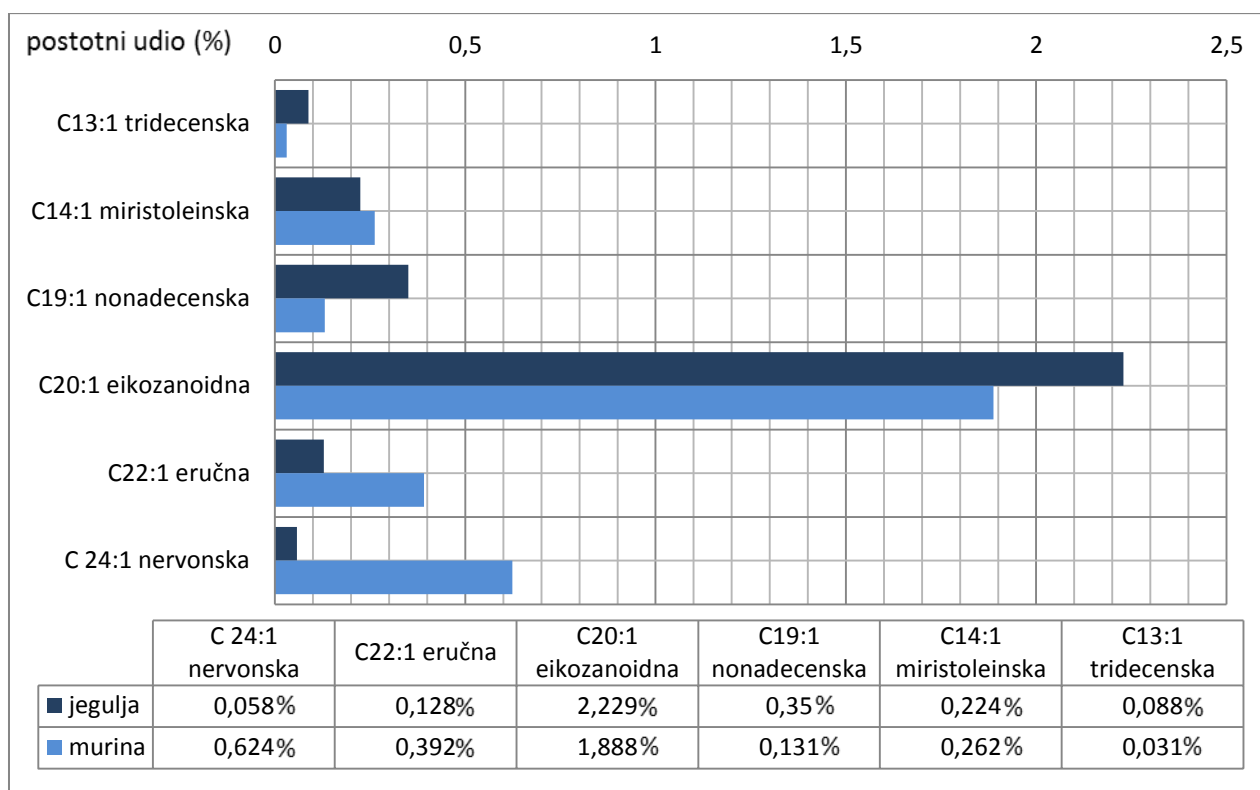
Količina nezasićenih masnih kiselina, a time i oleinske kiseline bila je visoko zastupljena u obje vrste, s većim sadržajem kod jegulje. Druga najzastupljenija masna kiselina je palmitoleinska kiselina (omega 7) (16:1) koja je prisutna ( $p \leq 0.05$ ) i kod murine i kod jegulje (Slika 16).



**Slika 16. Udjeli nezasićenih masnih kiselina kod jegulje i murine. (Masne kiseline su analizirane u tkivu mišića metodom plinske kromatografije)**

Rezultati grafa izraženi su kao % udjeli u ukupnom sastavu masnih kiselina.

Od mononezasićenih masnih kiselina, zastupljenijih kod jegulje nego kod murine, pronađene su tridecenska (13:1), nonadecenska (19:1) i eikozanoidna kiselina (20:1). Miristoleinska (14:1), eručna (22:1) i nervonska kiselina (24:1) su u nešto većem omjeru pronađene kod murine, nego što je to slučaj kod jegulje. Kod obje vrste prisutnost nezasićenih masnih kiselina (MUFA) bila je manja od 1%, s iznimkom eikozanoidne kiseline (Slika 17).



**Slika 17. Udjeli mononezasićenih masnih kiselina kod jegulje i murine. (Masne kiseline su analizirane u mišićnom tkivu riba plinskom kromatografijom)**

Rezultati grafa izraženi su kao % udjeli u ukupnom sastavu masnih kiselina..

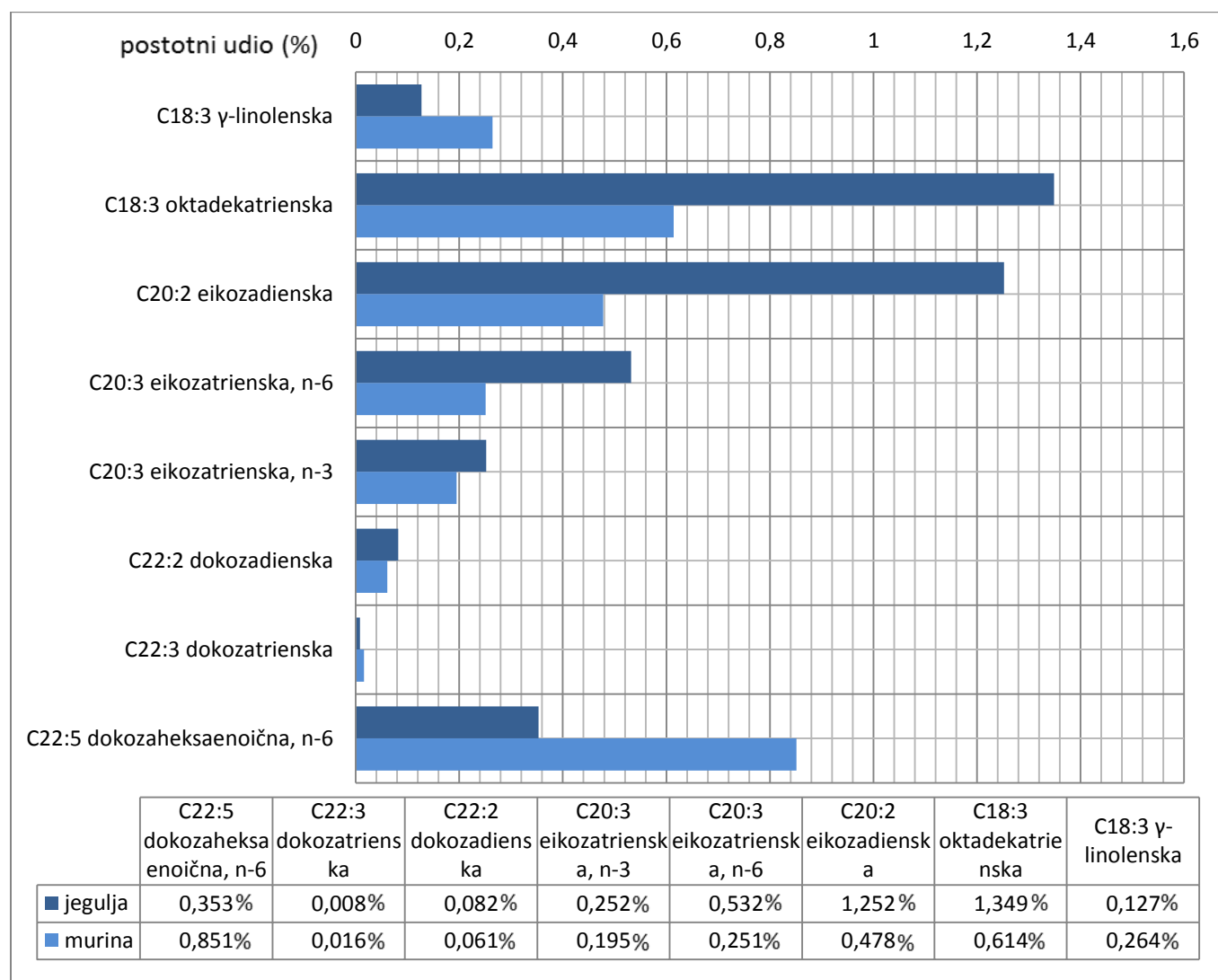
**Tablica 2. Indeks omjera pojedinih masnih kiselina unutar biosintetskog puta omega masnih kiselina jegulje i murine u kojima sudjeluju enzimi elongaze.**

Indeks	Jegulja	Murina
EPA/ $\alpha$ -LNA	1.64 <sup>a</sup>	6.39 <sup>b</sup>
DPA/EPA	0.85	0.61
DHA/DPA	1.03 <sup>a</sup>	5.63 <sup>b</sup>
SFA/UFA	0.39	0.52
PUFA/MUFA	0.33 <sup>a</sup>	0.80 <sup>b</sup>
n3/n6	0.74 <sup>a</sup>	3.01 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Vrijednosti označene različitim slovima statistički su različite ( $p \leq 0.05$ ) između istraživanih vrsta.

Tablica 2. prikazuje vrijednosti omjera između pojedinih masnih kiselina koje su supstrat ili proizvod biokemijskih pravaca u sintezi masnih kiselina. Murina ima znatno veći ( $p \leq 0.05$ ) indeks EPA /  $\alpha$ -LNA i DHA / DPA i znatno niži ( $p \leq 0.05$ ) indeks DPA / EPA od jegulje.

Slika 18. prikazuje sastav polinezasićenih masnih kiselina koje su u manjim količinama zastupljene kod jegulje i murine. U te masne kiseline spadaju:  $\gamma$ -linolenska (C18:3), oktadekatrienska (C18:3), eikozadienska (C20:2), eikozatrienska (C20:3) (n-6), eikozatrienska (C20:3) (n-3), dokoziadienska (C22:2), dokoziatrienska (C22:3) i dokozaheksaenoična (22:5) (n-6). Masne kiseline koje su zastupljenije kod murine su  $\gamma$ -linolenska, dokoziatrienska i dokozaheksaenoična. Sve ostale masne kiseline koje su prikazane na grafu u nešto su većim količinama pronađene kod jegulje.

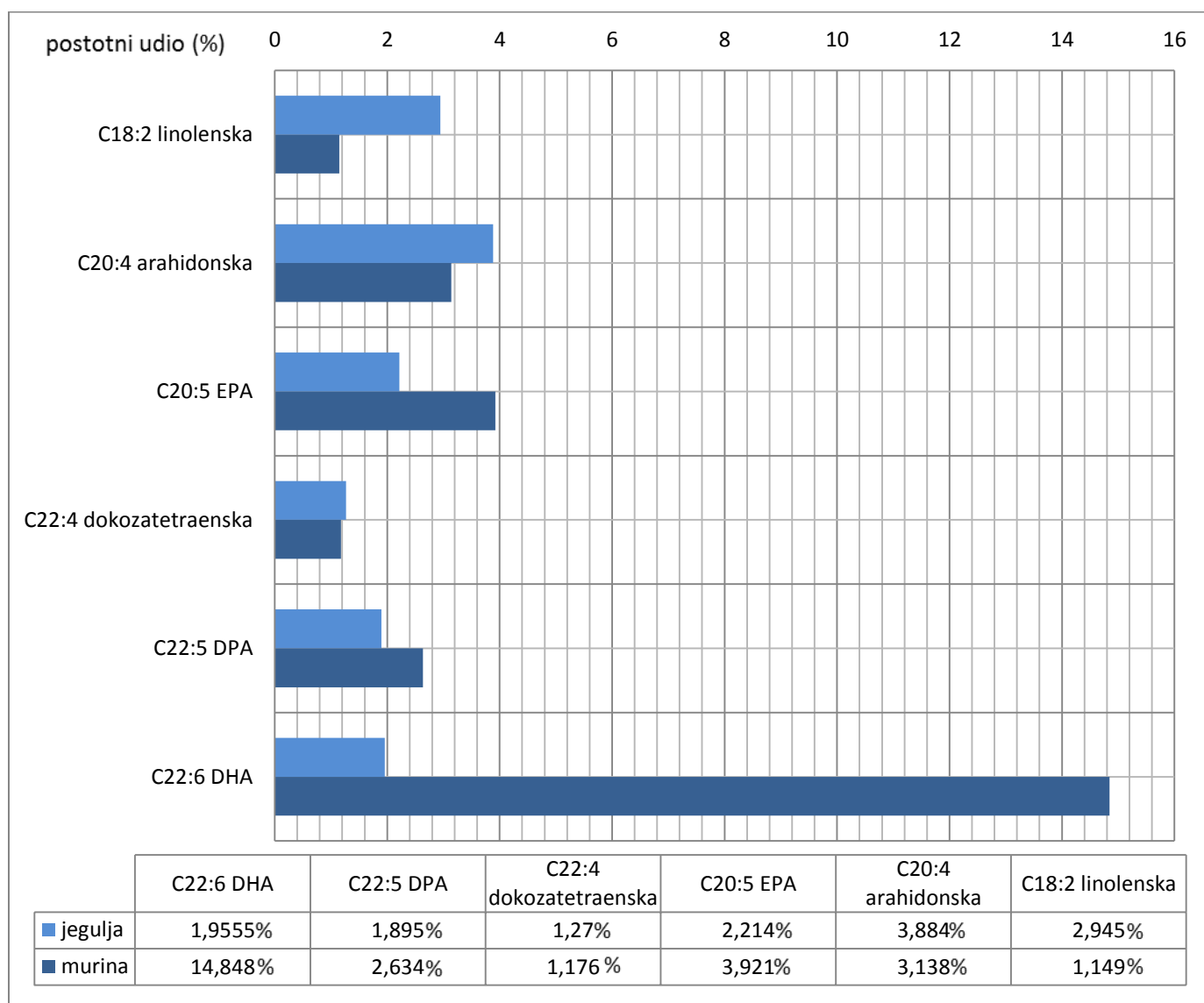


**Slika 18. Udio manje zastupljenih nezasićenih masnih kiselina u jegulje i murine**

**(Masne kiseline su analizirane u tkivu mišića plinskom kromatografijom)**

Kad govorimo o polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA), interspecijske razlike ( $p \leq 0.05$ ) bile su istaknute, i to kod murine koja je imala 7 puta više dokozaheksanske kiseline (DHA) od jegulje. Vrijednosti arahidonske kiseline (ARA, 20:4 n-6), bile su niže u murine, dok je razina eikozapentanske kiseline (EPA, 20:5 n-3), niža ( $p \leq 0.05$ ) u jegulje nego kod murine. Udio dokozapentanske kiseline (DPA, 22:5 n-3) je veći ( $p \leq 0.05$ ) u murine nego u jegulje. Na slici 19. su prikazane polinezasićene masne kiseline koje su u nešto većoj količini bile zastupljene od ostalih PUFA.

(Masne kiseline su analizirane plinskom kromatografijom u mišićnom tkivu riba). Rezultati grafa su prikazani u % udjelima u ukupnom sastavu masti.



**Slika 19. Udio više zastupljenih nezasićenih masnih kiselina u jegulje i murine**

#### 4. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti biokemijske razlike u profilu masnih kiselina u repnim područjima dviju srodnih vrsta *Anguilliformes*. Rezultati su pokazali da su obje vrste imale slične količine proteina, ali su postojale određene statističke razlike u sastavu masti. Murina je imala četiri do deset puta niži ( $p \leq 0.05$ ) postotak ukupnih lipida nego jegulja. Riba koja sadržava više od 5% lipida, smatra se masnom ribom. Zbog toga se i ove se vrste mogu smatrati takvima. Gledano sa stajališta ekotoksikologije, murina se može smatrati ribom visokog lipofilnog potencijala kao što je pokazano i na jegulji, iz prethodnih lipidnih sastava određenih jegulja (Arai i Takeda 2012). Među pojedinim masnim kiselinama koje su ovdje analizirane, kvantitativni je profil bio sličan, iako su kvalitativni sadržaj zasićenih masnih kiselina i MUFA bili specifični za svaku vrstu. PUFA je bila veća u murine, s DHA kao glavnim zaslužnim. Murina je za razliku od jegulje pokazala kvalitativno bolji sadržaj lipida.

Ovi se sažeti rezultati vezani za murinu ne mogu usporediti s vrijednostima iz literature, jer nisu pronađeni ukupni lipidni profili za tu vrstu. Za jegulju su referentne vrijednosti bile u skladu s napomenutim omjerima proteina i masti. Pokazano je da je u malim jeguljama, omjer lipida i proteina manji i ima tendenciju povećanja s veličinom životinje. Nadalje, lipidi imaju tendenciju da se akumuliraju u jegulja prije mrijesta migracije. U ovom istraživanju, treba imati na umu da su sve životinje potpuno odrasle jedinke.

Jegulja je uhvaćena u slatkoj/bočatoj vodi (rijeke Neretve), dok je murina prikupljena u moru (Jadransko more). Životinje koje obitavaju u vodama kod kojih je prisutna određena temperaturna promjena dolazi aktivacije različitih toplinskih prilagodbi, što utječe na pohranu lipida. Kod životinja koje borave u termički stabilnim uvjetima kao što je more, ne postoje takve toplinske prilagodbe budući da su uvjeti konstantni. Uočeno je da je kod riba koje borave na hladnijim staništima količina lipida veća. Također je uočeno da su kod većine jegulja koje obitavaju u različitim uvjetima varijacije u lipidnom sadržaju i profilima različitih tipova lipida male, te da su oni dosta stabilni. U usporedbi s koncentracijama mišićnih lipida, slično se objašnjenje može primijeniti za rezultate vezane za sadržaj vlage, budući da je murina imala veći sadržaj vlage od jegulje.

Fiziologija osmoregulacije može dati moguće objašnjenje za ovu razliku, jer morske ribe imaju tendenciju zadržati vodu kako bi spriječile trajnu fiziološku dehidraciju u slanoj vodi (Cowey, 1989). Rezultati za murinu su bili u skladu s pojedinačnim literaturnim izvješćima *Gymnothorax* sp.B,1795, Koja je imala udio suhe tvari od 28.3-34.8% sadržaj pepela 2.7-4.5%. Također postoje izvještaji za europske jegulje, kod kojih se suha tvar nalazi u rasponu 32,9-45,3% i koje sadrže vlagu u rasponu od 47.8-77.7%, što ovisi o veličini ribe i sazrijevanju (Salini, 2016). Sadržaj suhe tvari je također slijedio taj trend. Murina ima veće količine anorganskih spojeva od jegulje, kao što se vidi u omjeru pepela. Razina vrijednosti pepela ukazuju na to da je murina bolji izvor hranjivih minerala od jegulje.

Međutim, ako se smatra da je sadržaj lipida posljedica toplinske adaptacije, treba napomenuti da je u tropske vrste pronađen *C. cyaneus* pronađen sadržaj lipida od 21% (Baeza, 2014). Isto se tako, rezultati za murinu mogu samo usporediti u odnosu na već poznati sadržaj lipida u tropskog roda *Gymnothorax*, 10,9-14,1% W.W. (Baeza, 2014). Murina ima omjer lipida i proteina takav da pogoduje proteinima, što je biološko svojstvo za ovu vrstu, i to tek treba potvrditi u drugim rodovima iz obitelji i istražiti je li ovo svojstvo varijabla u razvojnim fazama. Iako okolišni čimbenici daju djelomično objašnjenje rezultata, treba se raspravljati o filogenetskom i taksonomskom kontekstu jer se pretpostavlja da je sadržaj lipida koji je ovdje zabilježen biološko svojstvo ove skupine životinja, odnosno Muraenidae.

Kvantitativna analiza sadržaja lipida pokazala je da su količine zasićenih masnih kiselina bile slične i kod murine i kod jegulje, a njihova količina odgovara uobičajenim rasponima omjera lipida kralježnjaka (Varljen i sur., 2003). Karakteristično je i da jegulja sadržava veći postotak oleinske kiseline.

Ove male različitosti i indeksi omjera između pojedinih masnih kiselina, kao što je veća količina  $\alpha$ -liniolenske ( $\alpha$ -LNA, 18: 3 n-3) i manja količina EPA (20: 5 n-3 i DHA (22 : 6 n-3), u jegulje, posredno upućuju na postojanje različitih biokemijskih puteva enzima elongaze i delta 5 i 6 desaturaze kod ovih vrsta. Elongaza i delta 5 i 6 desaturaza pretvaraju prekursor masnih kiselina  $\alpha$ -LNA u EPA a zatim u DPA, koja se zatim prevodi u DHA u jetri i crijevu (Ren, 2012). S biokemijskog ili fiziološkog položaja, indeksi omjera između tih masnih kiselina indirektno ukazuju da ovi putevi nisu korišteni u jegulja u istoj mjeri kao i kod murina.

Primjerice, omjer EPA:  $\alpha$ -LNA dobiva se dijeljenjem sadržaja molekule prekursora ( $\alpha$ -LNA) i produkta katalitičke aktivnosti elongaze (EPA). Približni indeksi pokazuju da je šest puta više produkta nego supstrata (molekula prekursor) kod murine, a samo 1,6 puta u jegulje. Slično tome, omjer prometa u elongaznom putu (Tablica 2) može se pratiti do finalnog proizvoda DHA. Osim toga, može se pratiti i ravnotežno stanje pretvaranja DHA u EPA. Nisu pronađene razlike o aktivnostima elongaze ili desaturaze enzima unutar ovog puta, iako je pokazano da za jegulje elongazna aktivnost pod određenim okolnostima može za 2 puta nadmašiti aktivnost elongaze sisavaca.

Pravo pitanje iz tablice 2 je koliko je elongazni sustav jači kod murine u odnosu na sisavce. Ti putevi su jednako učinkoviti i u jegulje i u murine. Onda se razlike u sastavima masnih kiselina moraju pripisati trofičkog fiziologiji i sastavu plijena. Murina konzumira 6.84% manje mase rakova i 9,23% više ribe u okviru svog plijena nego jegulja (Đikić i sur. 2012, 2014). To bi se moglo smatrati glavnim uzrokom razlika u PUFA i omega-3 između analiziranih vrsta. Pokušalo se pronaći vrijednosti iz literature za lipidne profile svake vrste koja je konzumirana i usporediti ih s rezultatima ovdje, ali za većinu rakova takvi podatci ne postoje. Zanimljiva je prisutnost kanibalizma kod nekih vrsta *Anguilliformesa*, kao npr. u ugora i njegov izostanak u murine, čime je konzumiranje plijena bogatog PUFA i omega-3 masnim kiselinama (sam ugor) doprinijelo još višim sadržajem istoga kod te vrste. Iako je zabilježeno da u određenom aspektu murina konzumira ugora.

Nutricionistički gledano, da bi se unijela ista količina povoljnih masnih kiselina kod murine, potrebno je konzumirati dvostruko veću količinu jegulje. To je pokazao profil nezasićenih masnih kiselina murine, povoljan sa zdravstvene perspektive, dok na suprotnoj strani, iz perspektive prehrambene tehnologije, dolazi do destabiliziranja kvalitete ribe zbog lakše oksidacije istoga, čime se riba kvari, brže raspada i dolazi do stvaranja ribljeg mirisa u proizvodima (Thomassen, 2016).

## 5. ZAKLJUČAK

Ovaj rad je pokazao da murina u svom organizmu sadržava relativno manju količinu masnih kiselina u odnosu na jegulju te da u tom raznolikom sadržaju prevladavaju veće količine omega masnih kiselina po jedinici ukupnih triglicerida. Sukladno očekivanjima na temelju trofičkih proučavanja ovih vrsta jeguljki, postoje razlike u sadržaju lipida i razlike u kvalitativnim lipidnim profilima pojedinih masnih kiselina. Te razlike indirektno ukazuju na razlike u fiziološkom korištenju biokemijskih elongaznih puteva i razlika u aktivnosti enzima. Ovaj je rad potvrdio da murina ima bolji sastav omega 3 i omega 6 masnih kiselina nego jegulja, kao i sastav drugih masnih kiselina, iako bioaktivna uloga specifičnih joj lipida ostaje nerazjašnjena.



## 6. LITERATURA

- Aitzetmüller K., Taraschewski H., Filipponi C., Werner G., Weber N. (1994). Lipids of fish parasites and their hosts, fatty acids of phospholipids of *Paratenuisentis ambiguus* and its host eel (*Anguilla anguilla*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 109 (2-3), str. 383-389.
- Arai T., Takeda A. (2012). Differences in organochlorine accumulation accompanying life history in the catadromous eel *Anguilla japonica* and the marine eel *Conger myriaster*, *Ecotoxicology*. 21 (4), str. 1260-1271.
- Baeza R., Mazzeo I., Vilchez M. C., Gallego V., Peñaranda D. S., Pérez L., Asturiano J. F. (2014). Effect of thermal regime on fatty acid dynamics in male European eels (*Anguilla anguilla*) during hormonally-induced spermatogenesis, *Aquaculture*. 430, str. 86-97
- Beare-Rogers J., Dieffenbacher A., Holm J.V. (2001). "Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report)", *Pure and Applied Chemistry*. 73 (4), str. 685–744.
- Cowey C.B., and Sargent, J.R. (1989), *Fish Physiology* (Hoar W.S., Randall D.J., Brett J.R., ur.) (8) str. 1–69, Academic Press, New York.
- Đikić D., Lisičić D., Matic-Skoko S., Tutman P., Skaramuca D., Franić Z., Skaramuca B. (2013). Comparative hematology of wild Anguilliformes (*Muraena helena* L. 1758 *Conger conger* L. 1758 and *Anguilla anguilla* L. 1758), *Animal Biology* 63 (1), str. 77-92.
- Goodnight S. H., Harris W. S., Conner W. E., Illingworth R. D. (1982). Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia and thrombosis, *Atherosclerosis*. 2 (2), str. 87-113.
- Hara T., Kimura I., Inoue D., Ichimura A., Hirasawa A. (2013). Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism., *Physiol. Biochem. Pharmacol.* 164, str. 77–116.
- Heimann W. Fundamentals of food chemistry. West Port, Connection, USA: Avi Pub. Co. 1982.
- *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2nd ed.). International Union of Pure and Applied Chemistry. Retrieved 2007-10-31.

- Jaya-Ram A., Shu-Chien A. C., Kuah M. K. (2016.) Echium oil increased the expression of a  $\Delta 4$  Fads2 fatty acyl desaturase and the deposition of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid in comparison with linseed oil in striped snakehead (*Channa striata*) muscle, *Fish Physiology and Biochemistry*. 42 (4), str. 1-16.
- Lands W. E. M. (2005). "Fish, Omega-3 and Human Health" Champaign. AOCS Press.
- Lehner R., Kuksis A. (1993). Triacylglycerol synthesis by an *sn*1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes, *J. Biol. Chem.* 268, str. 8781–8786.
- Liang X., Zhao Y., Li Y., Gao J. (2016). Identification and structural characterization of two peroxisome proliferator activated receptors and their transcriptional changes at different developmental stages and after feeding with different fatty acids, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 193, str. 9-16.
- Meer G., Voelker D. R., Feigenson G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2), str. 112– 124.
- Milovanović M. (2009). Occurrence, structures and estimation of daily intake of trans fatty acids, *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*. 54 (3), str. 247-256
- Murray D.S., Hager H., Tocher D.R., Kainz M.J. 2015. Docosahexaenoic acid in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), The importance of dietary supply and physiological response during the entire growth period, *Comparative Biochemistry and Physiology PartB: Biochemistry and Molecular Biology*. 181 (1), str. 7-14.
- Nichols P. D., Petrie J., Singh S. (2010). Long-Chain Omega-3 Oils–An Update on Sustainable Sources, *Nutrients*. 2 (6), str. 572-585
- Ren H.T., Yu J. H., Xu P., Tang Y. K. (2012). Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of  $\Delta 6$  desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 163 (2), str. 184-192.
- Rolfe R. D. (1984). Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*, *Infect. Immun.* 45(1), str. 185-191
- Salini M. J., Poppi D., Turchini G. M., Glencross B. D. (2016). Defining the allometric relationship between size and individual fatty acid turnover in barramundi

Lates calcarifer, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 201, str. 79-86.

- Stryer L. (2011). "Fatty acid metabolism.", *Biochemistry* (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. str. 603–628.
- Thomassen M.S., Bou M., Røsjø C., Ruyter B. (2016). Organ and phospholipid class fatty acid specificity in response to dietary depletion of essential n-3 fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture Nutrition*.
- Tocher D. R. (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective, *Aquaculture*. 449, str. 94-107.
- Turchini G. M., Nichols P. D., Barrow C., Sinclair A. J. (2012). Jumping on the Omega-3 Bandwagon: Distinguishing the Role of Long-Chain and Short-Chain Omega-3 Fatty Acids, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(9), str. 795-803
- Van Veldhoven P.P., Mannaerts G.P. (1986). Coenzyme A in purified peroxisomes is not freely soluble in the matrix but firmly bound to a matrix protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139, str. 1195– 1201.
- Young K. (2009). Omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) fatty acids in tilapia and human health, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60 (dod. 5) str. 203-211.

## **7. ŽIVOTOPIS**

### **Osobne informacije**

Ime i prezime: Ivona Cvetković

Datum rođenja: 24. studenog 1992.

Adresa: Petra Vrdoljaka 20/I, 21260 Imotski

e-mail: nonacvetkovic@gmail.com

Kontakt broj: 091/395-19 18

### **Obrazovanje**

**2014.-2016.** Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Smjer: Diplomski studij eksperimentalne biologije

Modul: Fiziologija i imunobiologija

**2011.-2014.** Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno matematički fakultet

Preddiplomski studij biologije i kemije

**2007.-2011.** Gimnazija dr. Mate Ujevića Imotski

Opća gimnazija

## **Iskustvo u struci**

### Laboratorijske vježbe:

Klinički bolnički centar Rebro (odjel za molekularnu dijagnostiku i transplantaciju)

Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)

Institut Ruđer Bošković (odjel za telomere)

### Laboratorijska praksa:

Zavod za animalnu fiziologiju na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu

## **Osobne i komunikacijske vještine:**

Materinski jezik: hrvatski      Strani jezici: engleski

Dobro razvijena intrapersonalna komunikacija kao rezultat preispitivanja vlastitih odluka i svakodnevnih pojavnosti, kao i interpersonalna komunikacija razvijena raznim diskusijama s kolegama i poznanicima

## **Digitalna kompetencija**

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi - Internet (e-mail, google+, društvene mreže)

